



Effets de l'entraînement en résistance, de la performance à l'unité contractile

Antony Philippe

► To cite this version:

Antony Philippe. Effets de l'entraînement en résistance, de la performance à l'unité contractile. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT4002 . tel-01342188

HAL Id: tel-01342188

<https://theses.hal.science/tel-01342188>

Submitted on 5 Jul 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par Université de Montpellier

**Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences du Mouvement Humain**

**Et de l'unité de recherche
UMR 866 Dynamique Musculaire et
Métabolisme**

Spécialité : Physiologie de l'exercice

Présentée par Antony PHILIPPE

**Effets de l'entraînement en résistance, de
la performance à l'unité contractile**

Soutenue le 4 décembre 2015 devant le jury composé de



Mr Jean-René LACOUR, Professeur émérite, Université Lyon II

Mr Carlo REGGIANI, PU, Université de Padoue

Mr Fabio BORRANI, HDR, Université de Lausanne

Mr Julien LAGARDE, MCU, Université de Montpellier

Mme Corinne LIONNE, DR, CNRS

Mr Robin CANDAU, PU, Université de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Présidente du jury

Directeur

*...à toi Guilhem, qui m'a mis des rêves plein la tête,
et toi Aude, avec qui je veux les réaliser...*

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier Jean René LACOUR et Carlo REGGIANI pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce jury. Je suis très honoré de vous présenter ces travaux. Je remercie également Julien LAGARDE, pour avoir accepté d'être membre de ce jury et pour m'avoir confié des enseignements de Neurosciences. Merci à Fabio BORRANI, avec qui j'ai beaucoup appris à travers nos discussions téléphoniques. Une partie des travaux n'aurait pu être réalisée sans ta contribution précieuse et ton expérience. Merci pour ta patience, et pardon de t'avoir harcelé de mails de dernière minute ! Merci à Corinne LIONNE, examinatrice, marraine de thèse mais également présidente du jury. Tu es pour moi LA référence en matière de myofibrilles et de cinétiques. J'ai énormément appris de ton expérience et de tes conseils aussi précieux que clairs. Les journées passées au Rapid Flow Quench vont me manquer !

Robin. A la fois directeur de thèse, mentor et ami, rien de tout ce qui est présenté ici n'aurait pu être réalisé sans toi, pas même un sport et vie ! Tu m'as réellement transmis cette passion pour la recherche, l'enseignement, et même pour les équations ! La réflexion autour de la recherche pouvait se faire aussi bien au labo avec un café, qu'aux pieds des voies. Pour parler de fonctions de transfert ou de moteurs moléculaires, y'a pas d'heures ou de lieux ! J'espère que tu as apprécié ces 3 dernières années autant que moi. Je t'appelle dimanche et on se fait une petite corrélation charge/perf au Thorac !

Parce que la recherche ne peut pas se faire seul, je tiens également à remercier toute l'équipe de la DMEM et particulièrement, Vincent, Guillaume, Anne et Arnaud pour nos discussions constructives et vos conseils. Je pense aussi à toute l'équipe technique (notamment Florance pour les entraînements à l'animalerie) et zootechnique. Florian, tu m'as beaucoup aidé depuis le début, je me félicite de t'avoir rencontré, je suis arrivé au bon endroit. On continuera les bonnes soirées comme avant ! Thomas, merci pour tes conseils sur la rédaction et pour m'avoir soutenu sur la fin (j'ai dû te transmettre pas mal de mon stress !). Merci aussi de m'avoir fait découvrir la slack au labo, ça a été une révélation ! Spéciale dédicace à Allan. Je te l'ai déjà dit, tu as énormément contribué à ce travail. Quand je pense aux RT-qPCR, tu as été mon professeur pour ces manips, et pour bien d'autres aussi ! Je te remercie aussi Gwen, pour tes conseils avisés quand je suis arrivé au labo. Faire une thèse avec vous, on ne pouvait pas rêver mieux

Parce que la recherche ne peut pas se faire sans le soutien des proches, je ne peux pas oublier mes amis. Jess, on en a fait du chemin depuis les soirées plage à la Réunion ! A toi ma colloc' internationale, ma presque-sœur, je suis fière de te présenter mon travail de ces 3 dernières années. Anne, toi aussi super colloc', merci beaucoup ! Heureusement que tu étais là dans les coups durs ! Jonathan Sensei, depuis médecine, on s'est bien débrouillé hein ? Tu m'a suivi et soutenu depuis le début, tu as été ma bonne conscience, ta contribution à ce travail est significative, là je dis merci ! Saïd et Gabrielle, merci de m'avoir hébergé, et pour votre soutien. Depuis le temps, vous avez toujours été là.

Je remercie bien sûr ma famille. Après m'avoir transmis vos passions pour la mer (papa) et pour l'escalade (maman), c'est à mon tour de vous transmettre la mienne. Même si vous n'avez jamais douté de moi, je ne pensais pas vous présenter un jour cet ouvrage.

Titre

Effets de l'entraînement en résistance, de la performance à l'unité contractile

Résumé

Ce travail de thèse vise à améliorer notre compréhension des effets l'entraînement en résistance sur la performance et le muscle strié squelettique. La dynamique de ces effets de l'entraînement a été appréhendée de façon systématique grâce à des outils issus de la théorie des systèmes, auprès de 26 rongeurs entraînés en résistance dans un protocole d'escalade avec charges additionnelles. Le modèle classique (Banister et coll, 1975) a permis de décrire les variations de performance de manière significative ($R^2 = 0,53$, $P < 0,001$). L'origine des gains de performance très marqués (+136% par rapport au groupe contrôle) a été recherchée parmi les mécanismes adaptatifs musculaires potentiels. A l'issue de l'entraînement, une augmentation de l'activité de la myosine ATPase de $123 \pm 61\%$ indépendante du phénotype a été observée par rapport aux animaux contrôles. Cette augmentation de la puissance chimique consommée semble liée à une augmentation de la vitesse des étapes d'hydrolyse de l'ATP et surtout de celle de la libération des produits de cette hydrolyse (*i.e.* ADP et Pi) accompagnant la bascule de la tête de myosine. Une nouvelle forme de plasticité musculaire semble avoir été identifiée. Sur la base des mécanismes adaptatifs musculaires, une nouvelle formulation mathématique plus physiologique du modèle des effets de l'entraînement a été proposée et a aboutit à une meilleure qualité d'ajustement ($R^2 = 0,71$, $P < 0,001$). La fonction impulsioneuse du modèle classique a été remplacée par une fonction exponentielle de croissance qui semble plus appropriée pour rendre compte à la fois des variations de performance mais aussi des adaptations qui surviennent au sein du tissu musculaire comme au sein des unités contractiles elles-mêmes.

Mots clé : myofibrille, activité ATPasique, modèle mathématique.

Title

Effects of resistance training, from performance to contractile unit

Abstract

This thesis work aims to improve our understanding of the effects of resistance training on performance and skeletal muscle. The dynamic of these effects of training has been apprehended systematically through tools from systems theory, with 26 rodents resistance trained on a climbing protocol with additional weights. The classical model (Banister et al, 1975) was suitable to analyze the training response ($R^2 = 0.53$, $P < 0.001$). The origin of the very marked performance gains (+ 136% compared to the control group) was investigated among the potential muscle adaptive mechanisms. At the end of the training program, an increase of $123 \pm 61\%$ in myosin ATPase activity independent of the phenotype was observed compared to control animals. This increase in myosin ATPase activity seems to occur precisely during the main myosin head isomerization step (*i.e.* powerstroke) that includes the liberation of the hydrolysis products, and to a lesser extent, during ATP hydrolysis step. A new form of muscular plasticity seems identified. Based on muscle adaptive mechanisms, a new mathematical formulation, more physiological, of the model of the training effects has been proposed and resulted in a better fit ($R^2 = 0.71$, $P < 0.001$). The impulse function of the traditional model has been replaced by an exponential growth function that seems more suitable to analyze both the training response and the adaptations that occur within the muscle tissue as in the contractile units themselves.

Key words: myofibril, ATPase activity, mathematical model.

Avant-propos

Tel un sportif qui s'entraîne en vue d'une place sur le podium, cet ouvrage est le résultat d'une longue période de préparation et de travail. Issu initialement d'une formation en Biologie axée sur la Neuropsychologie, réaliser une thèse sur la physiologie de l'exercice a constitué un véritable challenge pour moi. Pratiquant l'escalade, j'ai été particulièrement étonné de voir la capacité adaptative des rongeurs à cette activité, naturelle pour eux. Des études antérieures conduites dans mon laboratoire d'accueil ont montré qu'après seulement 4 semaines d'entraînement progressif, les rats étaient capables de développer des niveaux de force incroyables. Toutes proportions gardées, en suivant le même entraînement, je devrais pouvoir grimper une falaise de 10 m, avec mes directeurs de thèse et de laboratoire sur le dos ! C'est donc naturellement que je me suis intéressé aux effets de l'entraînement en résistance sur la performance et sur le muscle squelettique. J'ai pour cela opté pour deux approches à la fois très différentes sur le plan disciplinaire, mais également complémentaires.

Dans une première partie de mes travaux de recherche, j'ai adopté une approche essentiellement théorique, à travers les outils de modélisation. La modélisation des effets de l'entraînement sur la performance permet de mettre en relation d'une part la dynamique des exercices effectués (charge de travail) avec d'autre part, les variations de performance observées en réponse. Une des premières difficultés d'application d'un modèle réside dans la quantification précise des charges et des performances. Cette mise en relation charges / performance est opérée grâce à des fonctions de transfert. Exclusivement appliquée chez l'Humain, la théorie des systèmes permet aujourd'hui aux athlètes et aux entraîneurs d'optimiser les programmes d'entraînement en vue d'optimiser les gains de performance lors de compétitions. Dans le cas de la réhabilitation, elle permet de solliciter au mieux le membre blessé ou l'organisme déficient, tout en conservant le risque médical dans des limites acceptables. Cependant, les modèles utilisés jusqu'à présent sont essentiellement empiriques et l'on cherche encore la signification biologique des composants de ces modèles. Pour pallier à ce problème une nouvelle structure de modèle est proposée. Pour cela, nous avons en premier lieu tenté d'élargir les domaines d'application de la théorie des systèmes. Dans un premier temps, une méthode de quantification des charges d'entraînement et des performances a été proposée pour les activités sportives avec opposant (étude 1). Dans un second temps, nous avons vérifié si le modèle classique des effets de l'entraînement pouvait être appliqué de façon satisfaisante chez l'animal (étude 2). Comme énoncé, les rongeurs ont présenté une capacité

adaptive impressionnante, si bien que leur performance a plus que doublé à l'issue du programme d'entraînement. S'est donc naturellement posée la question relative à la nature des mécanismes adaptatifs, au sein des muscles sollicités, qui permettent de tels gains de performance. Pour tenter d'appréhender ces mécanismes, j'ai exploré les adaptations musculaires à l'entraînement. Cette approche expérimentale fait l'objet de la seconde partie de mes travaux de recherche. Dans une étude réalisée chez l'animal, (étude 3) nous avons quantifié les adaptations musculaires induites par l'entraînement. Les rongeurs entraînés ont montré des adaptations musculaires caractérisées principalement par une augmentation de la masse musculaire et par des changements phénotypiques en faveur d'un phénotype musculaire intermédiaire (porté essentiellement par les fibres de type 2A). Ces adaptations d'ordre quantitatives et d'amplitude modeste ne peuvent expliquer qu'en partie les gains de performance observés. Nous avons alors suspecté une adaptation plus fine, d'ordre qualitatif, intervenant à l'échelle moléculaire. Ainsi, l'activité ATPasique de la myosine ATPase a été étudiée au cours de la contraction musculaire sur myofibrilles en suspension. De manière intéressante, les gains de puissance chimique développée par tête de myosine sont comparables aux gains de puissance mécanique développée par les rats au cours de leur entraînement. Enfin, la mise en commun des résultats des études 2 et 3 nous ont permis de proposer un modèle plus physiologique, qui décrit les variations de la performance en réponse à l'entraînement, sur la base des cinétiques d'adaptation du muscle strié squelettique (étude 4, en cours). De cette manière, les adaptations musculaires pourraient être en mesure d'expliquer les gains de performance en réponse à l'entraînement en résistance.

Le choix de la structure de la thèse a été principalement guidé par cette double approche à la fois théorique et expérimentale. Dans le premier chapitre de la revue de la littérature, les aspects théoriques, attraités à la modélisation des effets de l'entraînement sont développés. Les adaptations du muscle squelettique en réponse à un entraînement de résistance sont détaillées quant à elles dans un second chapitre. Ensuite, les résultats des 4 études sont présentés et détaillés dans les manuscrits associés, puis discutés à la fin de cet ouvrage. Les techniques et méthodes originales employées au cours de la thèse ne font pas l'objet d'une partie en tant que telle, mais sont présentées au fil des chapitres, lorsque nécessaire. Elles sont par ailleurs développées dans les publications présentées.

TABLE DES MATIERES

Résumé / Abstract	IV
Avant propos	V
Liste des publications	XI
Liste des abréviations	XIII
Liste des publications	XIV

ETAT DE LA LITTERATURE **5**

Chapitre 1. MODELISATION DES EFFETS DE L'ENTRAINEMENT **6**

Principe : La théorie des systèmes	7
1. Quantification des charges et performance	9
1.1 Quantification de l'entraînement	9
1.1.1. Méthodes objectives	10
1.1.2. Une méthode subjective basée sur la perception de l'effort : Session-RPE	11
1.2. Quantification de la performance	12
2. Des modèles théoriques aux modèles physiologiques	14
2.1. Modèle de Banister	14
2.2. Les modèles à paramètres variables	16
2.3. Les modèles mixtes	18
2.3. Evolutions vers des modèles physiologiques	20
3. Validité des modèles	23
3.1. Ajustement des paramètres du modèle	23
3.1.1. La méthode des moindres carrés	23
3.2.2. La méthode des algorithmes génétiques	24
3.2. Légitimité des modèles à complexité croissante : Le gain de variance	30
4. Apport de la modélisation dans le domaine de l'entraînement et de la physiologie	33
4.1. Optimisation de la performance	33
4.2. Caractérisation des mécanismes sous-jacents à la performance : Les limites de l'athlète	38
Objectifs	41

Chapitre 2. DE LA CONTRACTION À LA PLASTICITÉ MUSCULAIRE 43

1. Contraction musculaire et ATP : Un cycle en mouvement -----	44
1.1. La relation structure - fonction du muscle squelettique -----	45
1.1.1. La fibre et ses myofibrilles -----	46
1.1.2. Le sarcomère et ses protéines -----	47
1.1.3. Cycle mécano-chimique : Une histoire qui ne tourne pas rond -----	58
1.2. L'activité ATPasique sur myofibrille -----	69
1.2.1. La myofibrille comme moyen d'étude -----	69
1.2.2. Une cinétique très rapide -----	71
2. Entraînement en résistance, prenez la force du bon côté -----	75
2.1. Les modèles d'entraînement en résistance chez le rat -----	76
2.1.1. L'entraînement par mimétisme -----	76
2.1.2 L'entraînement volontaire avec ou sans chocs électriques -----	78
2.1.3. Le modèle d'escalade : De Yarashesky à Bègue -----	79
2.2. La plasticité des fibres musculaires -----	81
2.2.1. Adaptations quantitatives, à l'échelle musculaire -----	82
2.2.2. Adaptations qualitatives, à l'échelle de la myofibrille -----	94
Objectifs -----	106

ETUDES REALISEES AU COURS DE LA THESE 107

Etude 1 : Quantification de la charge d'entrainement et de la performance au judo 108

Introduction ----- 109

Articles : ----- 110

Perceived training intensity and performance changes quantification in judo.
J Strength Cond Res. 2015 Jun; 29(6):1570-7.

Conclusion ----- 118

Etude 2 : Modélisation de la réponse à l'entraînement en résistance dans une étude expérimentale chez l'animal **119**

Introduction-----120

Article : -----121

Modeling response to resistance training in an animal experiment study.

Biomed Res Int. 2015 ; 2015:914860

Conclusion-----128

Etude 3 : La réponse musculaire à l'entraînement en résistance s'exprime essentiellement par une plasticité de l'activité ATPasique de la myosine **129**

Introduction-----130

Article -----132

Muscle plasticity in response to resistance training is mainly controlled by a myosin

ATPase adaptation. *Manuscrit en préparation*

Conclusion-----156

Etude 4 : Évolution du modèle classique des effets de l'entraînement vers une structure physiologique **158**

Article -----159

Manuscrit en préparation

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES **170**

Py G, Ramonatxo C, Sirvent P, Sanchez AMJ, Philippe AG, Douillard A, Galbès O, Lionne C, Bonniieu A, Chopard A, *et al.* 2015. Chronic clenbuterol treatment compromises force production without directly altering skeletal muscle contractile machinery. *The Journal of Physiology* 593: 2071-2084. -----177

Morquette P, Verdier D, Kadala A, Féthière J, Philippe AG, Robitaille R, Kolta A. 2015. An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nature Neuroscience* 18: 844-854. -----178

Liste des publications

Publications indexées ISI

- **Philippe, A. G.**, Py, G., Favier, F. B., Sanchez, A. M. J., Bonnieu, A., Busso, T., & Candau, R. (2015). Modeling the responses to resistance training in an animal experiment study. *BioMed Research International*, 2015, 914860. <http://doi.org/10.1155/2015/914860>
- Py, G., Ramonatxo, C., Sirvent, P., Sanchez, A. M. J., **Philippe, A. G.**, Douillard, A., ... Candau, R. B. (2015). Chronic clenbuterol treatment compromises force production without directly altering skeletal muscle contractile machinery. *The Journal of Physiology*, 593(8), 2071–2084. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.287060>
- Morquette, P., Verdier, D., Kadala, A., Féthière, J., **Philippe, A. G.**, Robitaille, R., & Kolta, A. (2015). An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nature Neuroscience*, 18(6), 844–854. <http://doi.org/10.1038/nn.4013>
- Agostinho, M. F., **Philippe, A. G.**, Marcolino, G. S., Pereira, E. R., Busso, T., Candau, R. B., & Franchini, E. (2014). Training perceived intensity and performance changes quantification in judo. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*. <http://doi.org/10.1519/JSC.0000000000000777>

Articles en cours d'écriture

- **Philippe A.G.**, Lionne C., Pagano A.F. et Candau R.B. Muscle plasticity in response to resistance training is mainly controlled by a myosin ATPase adaptation
- **Philippe A.G.**, Borrani F., Candau R.B. Evolution des modèles empiriques des effets de l'entraînement vers une structure physiologique

Chapitre de livre

- **Philippe A.G.**, Py G., Sanchez A.M.J., Formichi D., Chopard A., Candau R.B. (2013). Prévention des troubles musculo-squelettiques chez le sportif. Chapitre : Quantification des charges de réentraînement dans le cadre de la réhabilitation. Coordonné par M. Julia, JL Croisier, A Dupeyron, C Hérisson. Sauramps Médical Editeur

Articles de diffusion des connaissances

- Candau R.B., **Philippe AG**, Sanchez AMJ, Borrani F. Comment mieux filer au vent (2015). Sport et Vie N°151.
- **Philippe A.G.**, Candau R.B., Sanchez A.M.J., Jours de fête (2014). Sport et Vie N°146.
- **Philippe A.G.**, Sanchez A.M.J., Candau R.B. Malin comme un muscle (2014). Sport et Vie N°143
- **Philippe A.G.**, Candau R.B., La balade de la mer gelée (2103). Sport et Vie N°141.

Communications orales

- **Philippe A.G.**, Py G, Sanchez AMJ, Formichi D, Chopard A, Candau R (2013). Quantification des charges de réentraînement dans le cadre de la réhabilitation. 41ème Entretiens de Médecine Physique et Réadaptation (EMPR). Montpellier, 6-8 mai 2013
- **Philippe A.G.**, Lionne C., Pagano A.F., Candau R.B., (2015). 230% de gain de force : plasticité méconnue des têtes de myosine. 11^{ème} journée de l'Ecole Doctorale Sciences du Mouvement Humain. 29 mai 2015, Nice. 1^{er} prix communication orale.

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du modèle classique des effets de l'entraînement	7
Figure 2 : Réponse à une charge d'entraînement des fonctions d'aptitude et de fatigue du modèle de classique	15
Figure 3 : Organigramme des algorithmes génétiques	25
Figure 4 : Représentation schématique de notre algorithme génétique	27
Figure 5 : Méthode de détermination des paramètres du modèle	29
Figure 6 : Exemple d'ajustement de 2 modèles à complexité différente	31
Figure 7 : Relation entre la charge d'entraînement quotidienne / performance	34
Figure 8 : Evolution de la performance et des influences en réponse à l'entraînement	36
Figure 9 : Evolution du modèle d'interaction actine-myosine	44
Figure 10 : Organisation structurale du muscle strié squelettique	45
Figure 11 : Représentation schématique d'un sarcomère	48
Figure 12 : Représentation en ruban de l'actine-G	49
Figure 13 : Structure du complexe actine / tropomyosine	52
Figure 14 : Structure cristalline du fragment S1 de la myosine II	54
Figure 15 : Etats structuraux connus de la myosine	56
Figure 16 : Modèles fonctionnels proposés pour les moteurs actine-myosine	60
Figure 17 : Modèle d'initiation du powerstroke par le Pi	66
Figure 18 : Modèles proposés pour l'initiation du powerstroke	67
Figure 19 : Principe du Rapid Flow Quench	71
Figure 20 : Courbe typique de cinétique de production de Pi obtenue par RFQ	72
Figure 21 : Voies d'activation de MTOR lors de l'entraînement en résistance	85
Figure 22 : Processus de régulation de l'expression géniques des <i>Myh</i> suite à l'entraînement en résistance	91
Figure 23 : Relation charge / vitesse de contraction	93
Figure 24 : Relation concentration en myosine / tension spécifique	98
Figure 25 : Effet de l'entraînement sur la CSA, P_0 et P_0/CSA	100
Figure 26 : Coût énergétique et activité ATPasique des isoformes de myosine	102
Figure 27 : Effets de la température sur l'activité ATPasique en conditions activée et relaxe	103

Liste des abréviations

Actine-F : Actine filamentaire
Actine-G : Actine globulaire
ADP : Adénosine di-phosphate
ATP : Adénosine tri-phosphate
CSA : Surface de section des fibres
DTA : Diphtheria Toxin A
EDL : Extensor digitorum longus
ELC : Chaîne légère de myosine essentielle (Essential Light Chain)
FDP : Flexor Digitorum Profundus
FHL : Flexor Hallucis Longus
IQ motif : Motif de fixation à la calmoduline riche en isoleucine (I) et en glutamine (Q)
IVMA : Etude de motilité in vitro (In Vitro Motility Essay)
 k : Constante d'amplitude
MHC : Chaîne lourde de myosine (Myosin Heavy Chain)
mi-ARN micro ARN
MLC : Chaîne légère de myosine (Myosin Light Chain)
MLCK : Kinase des chaînes légères de myosine (Myosin Light Chain Kinase)
mTOR = Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1 et 2 : mTOR Complexes 1 et 2
MVC Force : Force maximale de contraction volontaire
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
P0 : Tension spécifique (Specific tension)
Pax7 : Paired box protein 7
Pax7-DTA : Lignée de souris transgénique double hétérozygote Pax7 et Rosa26
Pi : Phosphate
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
RHEB : Ras Homolog Enriched in Brain
RLC : Chaîne légère de myosine régulatrice (Regulatory Light Chain)
1-RM : Répétition maximale
S6K : Ribosomal protein S6 Kinase
TA : Tibialis Antérieur
TM : Tropomyosine
Tn : Troponine
TSC1 et 2 : Tuberous Sclerotic complex 1 et 2
 τ : Constante de temps
V0 : Vitesse de raccourcissement maximale à charge nulle (unloading velocity)
Vf : Vitesse de glissement de l'actine sur la myosine (sliding velocity)
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PGC1- α : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1- α AMPK :
5' Adenosin Mono Phosphate-activated protein Kinase
RT-qPCR : Reverse-Transcription quantitative Real-Time polymerase Chain Reaction
VMA : Vitesse Maximale Aerobie
TRIMP : Training IMPulse
PMA : puissance Maximale Aerobie

ETAT DE LA LITTERATURE

La nature ne fait rien sans objet

Aristote

- CHAPITRE 1 -

MODELISATION DES EFFETS DE L'ENTRAINEMENT

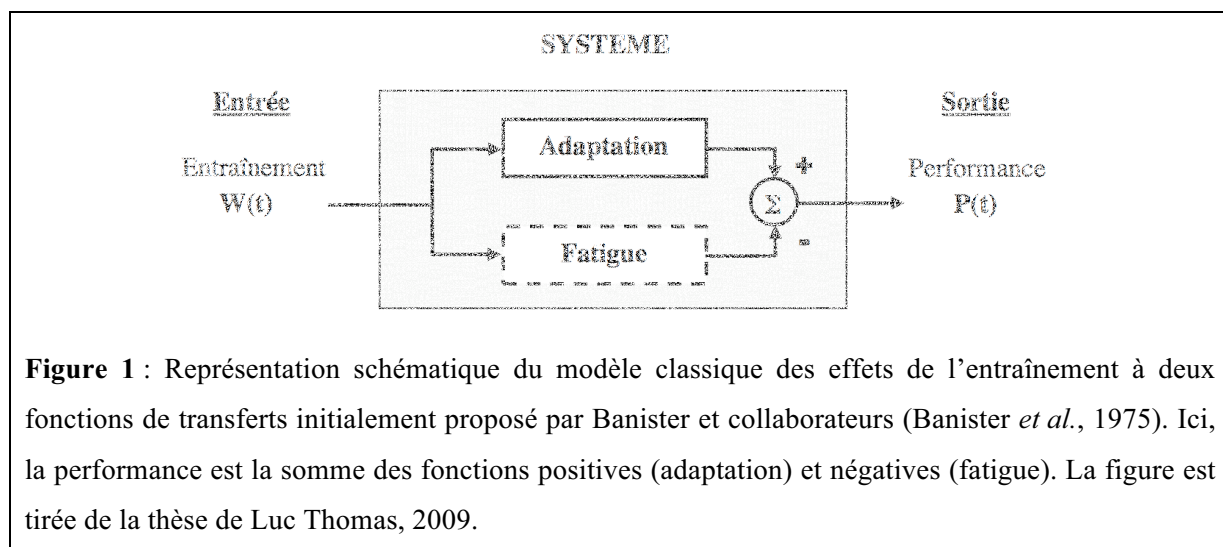
Principe : La théorie des systèmes

“The harder I train, the better I perform”. Tous les sportifs ont déjà entendu cet adage qui n’est pas sans fondement sur une échelle de temps qui s’évalue en mois ou en années (Berthouze *et al.*, 1995). Pourtant, sur une échelle de temps dont l’unité est le jour, la relation entraînement – performance n’est pas si simple, et loin d’être linéaire. Plusieurs études ont montré qu’au-delà d’un seuil de charge d’entraînement, la performance stagne (Marti, Abelin, & Minder, 1988; Foster *et al.*, 1996). En réalité, la relation entraînement – performance présente une forme de U - inversé qui montre bien la difficulté d’adapter l’entraînement pour optimiser la performance (Kuipers, 1998). Si la stimulation est trop forte et perdure trop longtemps (entraînement trop intensif), une diminution durable de la performance est observée. Ce phénomène appelé historiquement fatigue chronique est aujourd’hui désigné par le terme de syndrome de surentraînement (OTS en anglais pour “Over Training Syndrome”). Ce syndrome est caractérisé par une baisse de la performance souvent accompagnée de douleurs, d’infections, d’asthme, ou encore de troubles de l’humeur et/ou du sommeil [se référer à Purvis et collaborateurs pour revue de synthèse (Purvis, Gonsalves, & Deuster, 2010)]. Le syndrome de surentraînement doit être différencié de l’état d’overreaching, qui représente quant à lui une phase de surcharge associée à une diminution transitoire de la performance (Thiel *et al.*, 2011). A la différence du syndrome de surentraînement, l’overreaching est recherché. Ainsi, un entraînement présentant une période de surcharge précèdent une période d’affûtage (“taper” en anglais), pendant laquelle la quantité d’entraînement est diminuée, détermine des gains de performance extrêmement marqués d’où l’intérêt de cette stratégie d’entraînement pour la préparation finale d’une saison de compétition (Thomas & Busso, 2005; Thomas, Mujika, & Busso, 2008; Sanchez *et al.*, 2013).

Ces observations factuelles sont en accord avec la théorie des effets de l’entraînement selon laquelle la performance serait le résultat de la somme des effets positifs (assimilables à l’adaptation, ou à de l’aptitude) et négatifs (assimilables à de la fatigue) engendrés par l’entraînement. Par exemple, lors d’une période de surcharge, la baisse de la performance observée est liée à un déséquilibre transitoire entre les effets positifs et négatifs en faveur de la fatigue. Dans le cadre de la rééducation ou de la reprise d’une activité physique, la stratégie est de maximiser l’aptitude tout en gardant les niveaux de fatigues dans des bornes

limitées et contrôlées. Dans le cadre de l'entraînement sportif et en période de préparation, il s'agit plutôt de travailler à des charges pas trop éloignées de celles qui déterminent des gains optimaux de performance. A l'approche de l'objectif de la saison, il s'agit d'avoir recours à une stratégie de surcharge affûtage qui permet d'obtenir encore quelques gains substantiels de performance. Dans ce contexte, la modélisation des effets de l'entraînement apparaît comme un outil précieux pour favoriser les adaptations musculaires et la performance.

La modélisation des effets de l'entraînement sur la performance repose sur la théorie des systèmes. Cette théorie proposée pour la première fois par Banister et collaborateurs (Banister *et al.*, 1975) assimile l'individu à une boîte noire qui répond à une stimulation d'entrée (entraînement) et produit une réponse de sortie (performance). La structure du système (et donc du modèle) est définie par une ou plusieurs fonction(s) de type impulsionnelle(s) dite(s) “de transfert” reliant l'entrée à la sortie (**figure 1**). Cette représentation simplifiée de l'athlète constitue une première limite de cet outil de modélisation dans la mesure où l'entrée du système est réduite à la succession des charges de travail. Les autres facteurs comme la qualité du sommeil, l'état nutritionnel ou émotionnel par exemple ne sont pas pris en compte. Ici, la modélisation impose cette simplification et réduit l'entrée du système au facteur le plus important, la charge de travail. Le choix de la structure même des fonctions est évidemment important de même que celui de la méthode d'appréciation des variables d'entrée et de sortie (Doucet & Sloep, 1992). La quantification de ces variables représente donc la première étape dans le processus de modélisation. Au final l'analyse statistique permet de vérifier la qualité de l'ajustement du modèle aux données de l'entraînement et la validité du modèle proposé.



1. Quantification des charges et performance

1.1 Quantification de l'entraînement

Lors du processus de modélisation des effets de l'entraînement, la première étape consiste en la quantification de l'entrée du système, c'est à dire, des charges d'entraînement. La charge représente la somme des contraintes imposées à l'organisme durant une séquence d'entraînement (Busso, Carasso, & Lacour, 1991). Il existe néanmoins de nombreuses méthodes de quantification applicables dans des situations spécifiques. Certaines sont objectives et prennent en compte des données mesures mécaniques ou biologiques comme la fréquence cardiaque et le taux de lactate sanguin (Banister & Hamilton, 1985) et d'autres sont basées sur la difficulté perçue de la séance d'entraînement (Foster *et al.*, 1996). Le choix de la méthode de quantification est essentiellement guidé par le type d'exercice considéré. Par exemple, lors d'une séance d'endurance comme la course, la fréquence cardiaque augmente et tend à se stabiliser. Sa mesure reflète l'intensité de l'exercice et peut donc être employée pour quantifier la charge (Banister & Hamilton, 1985). Par opposition, lors d'une activité de force comme l'haltérophilie, l'exercice est de courte durée et le système cardiovasculaire n'atteint pas un état stable. La solution dans cette activité simple est de considérer le travail mécanique fournit au travers du nombre d'exercice effectué et de la masse soulevée (Busso *et al.*, 1990). Cependant, bon nombre d'activités physiques sont plus complexes. Dans le cas des exercices intermittents comme les sports collectifs ou de combats, la quantification est plus délicate. Ni le travail mécanique ni la fréquence cardiaque ne sont facilement utilisable pour apprécier les charges d'entraînement. La quantification s'appuie alors classiquement sur d'autres paramètres plus subjectifs comme la perception de la difficulté de la séance d'entraînement (Foster *et al.*, 1996).

1.1.1. Méthodes objectives

De nombreuses méthodes basées sur des mesures physiologiques ont été formulées selon le type d'activité physique. Les travaux de Banister et Morton (Banister & Hamilton, 1985; Morton, Fitz-Clarke, & Banister, 1990) chez les coureurs à pied sont à l'origine de la première formulation de la quantification de la charge (w) qui prend la forme :

$$w = \text{durée} * \Delta FC \text{ ratio} * Y$$

Où w est exprimée en training impulses (TRIMPs), la durée est exprimée en minutes, $\Delta FC \text{ ratio}$ est basé sur l'élévation de la fréquence cardiaque à l'exercice au-dessus de la fréquence cardiaque de repos et Y est un facteur de pondération prenant en compte l'élévation du taux de lactate sanguin en fonction de l'exercice (Green *et al.*, 1983). Cette formulation, de la forme intensité * durée * Y a été ensuite appliquée au ski de fond (Candau, Busso, & Lacour, 1992) et au triathlon (Banister, Carter, & Zarkadas, 1999; Millet *et al.*, 2002). Pour les nageurs, la charge est déterminée par des distances parcourues à différentes intensités (déterminées par la vitesse de nage) pondérées par un facteur proportionnel au taux de lactate sanguin mesuré au préalable à ces différentes intensités (Mujika *et al.*, 1996). Cette méthode a plus tard été adaptée pour prendre en compte la durée passée à intensité maximale (Avalos, Hellard, & Chatard, 2003; Hellard *et al.*, 2005, 2006). Dans les exercices de force, la quantification de la charge d'entraînement passe principalement par le nombre de répétitions. C'est le cas de l'haltérophilie (Busso *et al.*, 1990, 1992) et du lancer de marteau (Busso, Candau, & Lacour, 1994). Pour les activités complexes nécessitant un haut niveau de coordination, la quantification de la charge de travail doit être adaptée. Par exemple en gymnastique, la quantification de la charge de travail est basée sur la répétition d'éléments ou d'enchaînement d'éléments gymniques. Chaque élément ou enchaînement est pondéré par un coefficient spécifique à l'appareil utilisé. Lorsque plusieurs éléments sont réalisés, chacun d'entre eux est multiplié par un coefficient de 1,5. Ce coefficient passe à 3 pour chaque élément lorsque ces derniers sont réalisés lors d'un enchaînement complet (Sanchez *et al.*, 2013) :

$$w = N_{\text{éléments}} * P + N_{PP} * 15$$

Où w est la charge d'entraînement, $N_{\text{éléments}}$ est le nombre d'éléments gymniques, P est un coefficient de pondération égale à 1,5 ou 3 et N_{PP} est le nombre d'exercice de préparation

physique. Cette méthode, très spécifique à la discipline sportive a permis de décrire précisément la réponse à l'entraînement en gymnastique en fonction des charges et d'identifier l'effet de différentes phases de surcharge et d'affûtage sur la performance.

Toutes ces méthodes de terrain présentent nécessairement une marge d'imprécision dans la quantification des charges. Pour pallier à cela, plusieurs études ont été réalisées sur cycloergomètre par Busso et collaborateurs (Busso *et al.*, 1991, 1997, 2002; Busso, 2003). Basées sur la consommation maximale en oxygène et sur la puissance développée associée (PMA), ces méthodes ont l'avantage de la précision des mesures et de la standardisation des séances d'entraînement.

1.1.2. Une méthode subjective basée sur la perception de l'effort : Session-RPE

La difficulté perçue (RPE, pour Rating of Percieved Exertion en anglais) est un mode d'estimation de l'intensité (ou de la charge comme nous le verrons ultérieurement) d'entraînement réalisé par le sujet ou l'athlète lui-même. Initialement, le RPE était établi sur la base d'une échelle de Borg allant de 6 à 20 (Borg, Holmgren, & Lindblad, 1981) puis rapidement remplacée par le CR-10 (Category-Ratio-10 scale) (Borg, 1982; Borg, Hassmén, & Lagerström, 1987). Dans ces échelles, la valeur la plus basse représente une intensité d'entraînement très faible et la valeur la plus élevée, une intensité maximale. Foster a proposé une méthode de calcul à partir du RPE de la forme (Foster *et al.*, 1996) :

$$w = RPE * durée$$

Où la durée de l'exercice d'entraînement est exprimée en minutes, w est exprimée en unité arbitraire, et le RPE est reporté par l'athlète 30 minutes après la fin de la séance. Dans le cas des exercices de force, la durée peut être remplacée par le nombre de répétitions (Day *et al.*, 2004; Sweet *et al.*, 2004).

Cette méthode a été employée pour quantifier la charge de travail lors de sports d'endurance (Foster *et al.*, 2001; Wallace, Slattery, & Coutts, 2009), de sport d'équipe (Impellizzeri *et al.*, 2004; Alexiou & Coutts, 2008) ou encore de résistance (Day *et al.*, 2004; Sweet *et al.*, 2004). Les résultats indiquent que le RPE semble un bon indicateur du stress physiologique induit par l'entraînement et permet aux athlètes de programmer et d'adapter la charge de leurs séances d'entraînement. Cependant, la corrélation attendue entre la charge calculée à partir de la session-RPE et la méthode de TRIMPs n'est pas toujours élevée. Ainsi, Impellizzeri et collaborateurs ont rapporté des corrélations individuelles (r) entre ces deux

méthodes allant de $r = 0,50$ à $r = 0,77$ (Impellizzeri *et al.*, 2004) lors de la pratique du football. Une étude de Borresen et Lambert conclue que la session-RPE serait une bonne méthode pour quantifier la charge d'entraînement mais qu'elle serait peu fiable lorsque les athlètes travaillent une part significative de leur temps d'exercice à des intensités très faibles ou très élevées (Borresen & Lambert, 2009). En 2011, Haddad et collaborateurs ont mis en évidence une bonne corrélation entre la charge de travail quantifiée à partir de la session-RPE et 2 méthodes basées sur la fréquence cardiaque ($0,55 < r < 0,90$; $p < 0,001$) pour des athlètes pratiquant le taekwondo (Haddad *et al.*, 2011). Plus récemment, une équipe a comparé différentes méthodes de quantification des charges chez des athlètes entraînés en endurance en course à pied (Wallace, Slaterry, & Coutts, 2014). Les auteurs ont appliqué la théorie des systèmes et utilisé un modèle à fatigue variable (Busso, 2003), qui sera détaillé ultérieurement (partie 2.3). La performance modèle était corrélée à la performance réelle pour chaque sujet avec des r^2 de $0,6 \pm 0,1$ et $0,65 \pm 0,13$ selon que la charge d'entraînement était calculée à partir de la méthode de Banister et de la session-RPE, respectivement (Wallace *et al.*, 2014). La méthode session-RPE est moins précise que celle de Banister mais demeure une solution alternative pour les activités où les mesures biologiques sont difficiles d'accès comme pour la gymnastique ou les sports de combat.

1.2. Quantification de la performance

Une fois la quantification de la charge d'entraînement réalisée, le problème de la quantification de la sortie au système se pose. La performance nécessite une quantification à la fois précise et fréquente. La méthode de quantification doit donc être la plus simple et la plus reproductible possible. Ces contraintes rendent l'application de la modélisation parfois difficile, notamment dans certains sports. Classiquement, la performance s'exprime dans le système international de mesure. Cela peut être en unité de temps pour les durées de courses à pied (Banister *et al.*, 1999), en unité de masse pour les charges maximales levées lors de squats (Busso *et al.*, 1990, 1992), en mètres pour les distances parcourues (Busso *et al.*, 1991) ou les projectiles lancés (Busso *et al.*, 1994), ou en watt pour les puissances développées (Busso *et al.*, 1997, 2002; Banister *et al.*, 1999; Busso, 2003). Afin de pouvoir comparer les valeurs entre les individus, la performance mesurée est souvent exprimée en pourcentage de la performance maximale (record) de l'athlète (Mujika *et al.*, 1996; Avalos *et al.*, 2003; Hellard *et al.*, 2005), de sa performance initiale en début d'entraînement (Busso *et al.*, 1991) ou encore de la performance moyenne durant l'entraînement (Millet *et al.*,

2002). Ces méthodes ont été appliquées avec succès dans des activités aérobies comme la natation, la course ou le cyclisme et dans des activités explosives comme le lancer de marteau. Cependant, comme pour la quantification de la charge de travail, la quantification de la performance est plus délicate dans les activités complexes. En gymnastique, la performance ne peut pas être estimée à partir des résultats en compétition car les athlètes ne participent pas à suffisamment de compétitions par an, et le nombre et la fréquence de mesures de performance seraient trop faible pour pouvoir appliquer la théorie des systèmes. De plus, en compétition, la performance est traduite par des notes établies par un jury et prend donc une dimension subjective. Malgré tout, la performance mesurée doit refléter l'effort fourni en compétition. Une solution a été proposée à partir des données collectées durant les séances d'entraînement (Sanchez *et al.*, 2013). La performance est évaluée sur un versant purement physique et un essentiellement technique, pondérés respectivement par des coefficients de 0,5 et 1. Le versant physique représentait simplement le nombre maximal de tractions réalisé en 15 secondes. La qualité des éléments techniques est appréciée, quant à elle, par l'entraîneur qui quantifiait le nombre de répétitions parfaites sur 7 essais :

$$Performance = 1 * N_{technique} + 0,5 * N_{physique}$$

Où $N_{technique}$ est nombre de répétitions parfaites sur 7 répétitions d'un élément technique et $N_{physique}$ est le nombre maximal de tractions sur 10 s. Cependant pour les sports de combat, la quantification des performances est particulièrement délicate. Non seulement le nombre de compétitions est trop faible pour servir de critère de performance, mais les arts martiaux représentent des activités de type ouvertes, le résultat dépend de l'athlète lui-même, mais également du niveau de son adversaire. C'est certainement pour ces raisons qu'aucune étude à notre connaissance n'a encore tenté d'appréhender de façon systématique le processus d'entraînement dans ce type d'activité. Les deux premiers problèmes à résoudre résident dans la quantification performance et des charges d'entraînement. C'est l'objet de l'étude 1.

2. Des modèles théoriques aux modèles physiologiques

2.1. Modèle de Banister

Classiquement la performance sportive est présentée comme le résultat de ressource dans 4 domaines bien distincts : puissance aérobie et endurance, force et puissance musculaire, habileté motrice (technique), et facteurs psychologiques (résistance mentale) (Banister *et al.*, 1975). Le premier modèle mettant en relation la dynamique des charges d'entraînement avec les variations de performance a été proposé par Banister et Calvert (Banister *et al.*, 1975). L'analyse de la réponse à l'entraînement et leurs observations sur les variations de la performance en réponse à différentes charges de travail chez les nageurs les ont conduit à la réflexion suivante : immédiatement après une séance d'entraînement, la performance décroît, puis retrouve son niveau initial avant de le dépasser. La performance serait ainsi réduite à la somme de deux fonctions de transferts caractérisant chacune la fatigue et l'aptitude générées par l'entraînement :

$$Performance = Aptitude - Fatigue$$

La structure mathématique des fonctions de transfert d'aptitude et de fatigue est de type impulsionnel en réponse à une charge d'entraînement :

$$g(t) = k_1 e^{\frac{-t}{\tau_1}} - k_2 e^{\frac{-t}{\tau_2}}$$

Où k_1 , k_2 , τ_1 et τ_2 sont les constantes d'amplitude et de temps pour l'aptitude et la fatigue, respectivement.

Lorsque l'on modélise les effets de l'entraînement sur la performance, on obtient en sortie de système une performance dite modèle, notée $p(t)$, qui varie au cours du temps en fonction de l'évolution de la charge d'entraînement $w(t)$:

$$p(t) = p_0 + w(t) * g(t)$$

Où $g(t)$ est la réponse impulsionnelle, p_0 la performance initiale et $*$ le produit de convolution.

D'après la définition du produit de convolution, la performance devient :

$$p(t) = p_0 + \int_0^t g(t - t'). w(t) dt'$$

Avec $t = n\Delta t$ et $\Delta t = 1$. La discrétisation de l'intégrale donne :

$$\hat{p}_n = p_0 + \sum_{i=1}^{n-1} k_1 w_i e^{-\frac{(n-i)}{\tau_1}} - \sum_{i=1}^{n-1} k_2 w_i e^{-\frac{(n-i)}{\tau_2}}$$

Où \hat{p}_n est la performance modèle au jour n , w_i représente les charges successives avec i variant du jour 1 à $n - 1$.

La discrétisation du produit de convolution permet d'obtenir les fonctions aptitude (FP) et de fatigue (FN) :

$$FP = p^* + k_1 \sum_{i=1}^{n-1} e^{-\frac{(n-i)}{\tau_1}} w_i \quad \text{et} \quad FN = k_2 \sum_{i=1}^{n-1} e^{-\frac{(n-i)}{\tau_2}} w_i$$

Où p^* est la performance initiale, et w_i est la charge d'entraînement du jour i .

Selon ce modèle, la performance représente la différence entre l'aptitude et la fatigue déterminées elles même par des constantes de proportionnalité ou gains, respectivement k_1 et k_2 et par des constantes de temps, respectivement τ_1 et τ_2 . Les constantes de proportionnalité déterminent l'amplitude d'élévation immédiate des niveaux de fatigues et d'aptitude suite à une charge de travail. Les constantes de temps déterminent le temps nécessaire pour que l'aptitude et la fatigue reviennent à leur niveau initial. Lorsque $t = 4 \tau$, la composante (aptitude ou fatigue) est diminuée de 98%. Après une charge d'entraînement, la performance décroît car le niveau de fatigue généré est supérieur au niveau d'aptitude ($k_1 < k_2$). Puis, la performance augmente car la fatigue décroît plus rapidement que l'aptitude ($\tau_1 > \tau_2$). Ainsi, une charge d'entraînement induit dans un premier temps une diminution de la performance, puis dans un second temps, son augmentation (**figure 2**). Dans cette première formulation de modèle, les paramètres (constantes d'amplitudes et de temps) sont supposés invariants au cours du temps comme leur nom l'indique. Un dérivé de ce modèle a été proposé par Calvert et collaborateurs (Calvert *et al.*, 1976) dans le but de prendre en compte un effet potentiellement différé de l'entraînement sur l'aptitude. Ce nouveau modèle, dont l'aptitude est décrite par une fonction bi-exponentielle et la fatigue par une simple

exponentielle, possède donc au total 3 fonctions de transferts. Cependant, ce modèle semble tombé en désuétude probablement car l'ajout d'une seconde fonction de transfert pour l'aptitude n'était pas nécessaire pour décrire les variations de performance en réponse aux charges d'entraînement. Il existe néanmoins d'autres évolutions de la structure même du modèle qui ont été proposées et qui quant à elles semblent mieux décrire la réalité du processus d'entraînement (Busso, 2003).

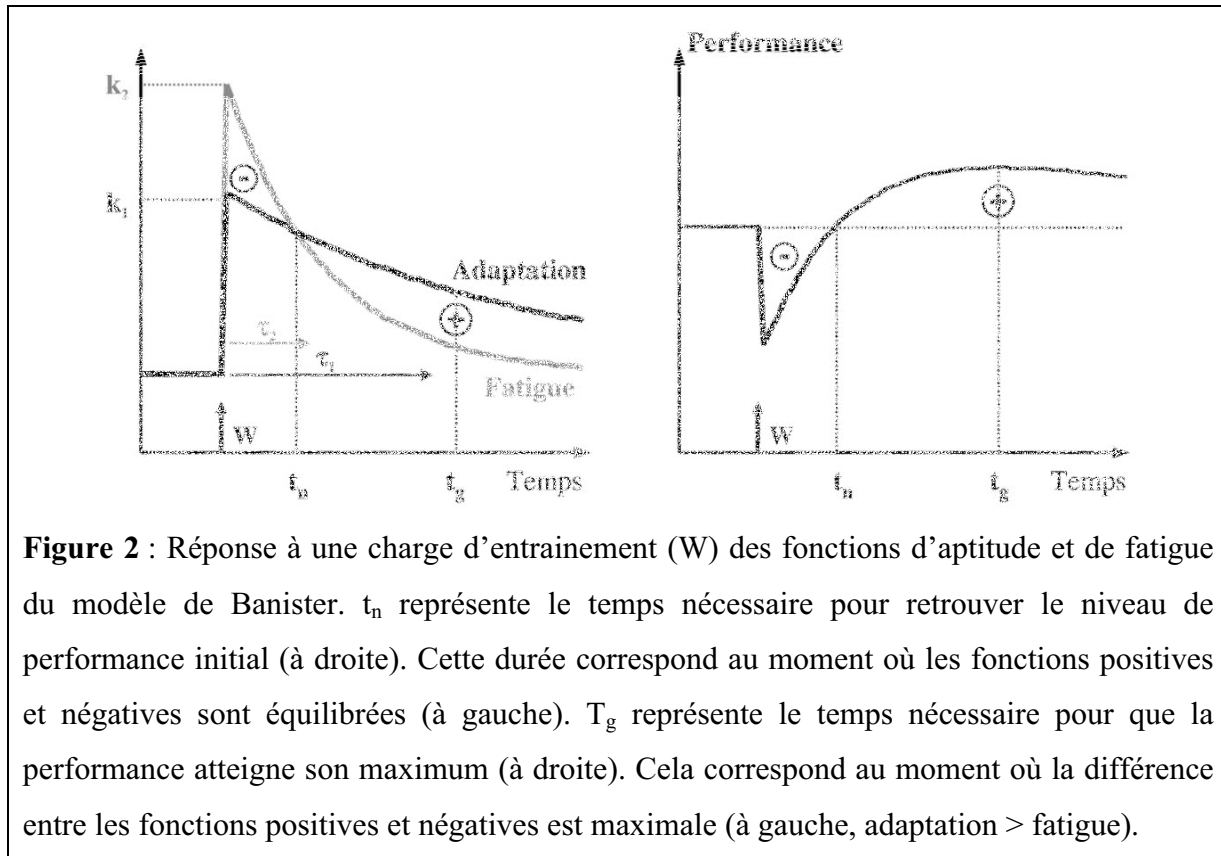


Figure 2 : Réponse à une charge d'entraînement (W) des fonctions d'aptitude et de fatigue du modèle de Banister. t_n représente le temps nécessaire pour retrouver le niveau de performance initial (à droite). Cette durée correspond au moment où les fonctions positives et négatives sont équilibrées (à gauche). T_g représente le temps nécessaire pour que la performance atteigne son maximum (à droite). Cela correspond au moment où la différence entre les fonctions positives et négatives est maximale (à gauche, adaptation > fatigue).

2.2. Les modèles à paramètres variables

Dans des conditions spécifiques d'entraînement sur cycloergomètre, un modèle comportant une simple fonction de transfert suffit pour décrire les effets de l'entraînement sur la performance. Le modèle à 3 composantes de Calvert et collaborateurs n'apportait aucun élément significatif supplémentaire (Busso *et al.*, 1991). L'explication proposée était que l'entraînement était insuffisant pour induire un effet négatif significatif et donc ne nécessite pas de fonction de transfert supplémentaire pour décrire les variations de performance.

Le modèle de Banister considère que les paramètres sont constants au cours de la période étudiée, ce qui n'est pas en accord avec les résultats de plusieurs études ultérieures conduites sur des périodes d'entraînement très contrastées (Busso *et al.*, 1997, 2002; Busso, 2003). Pour prendre en compte la dynamique des charges d'entraînement et leurs effets cumulés sur la performance Busso et collaborateur ont proposé un modèle adapté de celui de Banister pour permettre à aux paramètres de varier en fonction des périodes d'entraînement (Busso *et al.*, 1997). Dans ce modèle, un algorithme récursif réévalue les paramètres chaque jour où la performance était mesurée. Ce modèle a permis de mieux appréhender la complexité des effets cumulés de l'entraînement et a montré qu'une intensification de la charge d'entraînement induit une augmentation de la fatigue caractérisée par une augmentation de ses constantes d'amplitude et de temps. Par ailleurs, une augmentation de la fréquence des séances d'entraînement induit une augmentation du temps de récupération chez les sujets, passant de 1 jour à plus de 3 jours (Busso *et al.*, 2002). Ces résultats montrent bien une accumulation de la fatigue en situation d'entraînement intensif et la nécessité de laisser les paramètres du modèle varier afin de se rapprocher un peu plus de la réalité de l'entraînement. C'est dans ce contexte que Busso a proposé un nouveau modèle incluant une fatigue variable (Busso, 2003). Dans ce modèle, k_2 n'est plus une constante mais varie au cours du temps en réponse aux doses d'entraînement :

$$k_{2(t)} = k_3 e^{-\frac{t}{\tau_3}}$$

Où k_3 et τ_3 sont respectivement une constante d'amplitude et de temps. La réponse impulsionnelle à une dose d'entraînement devient :

$$g(t) = k_1 e^{\frac{-t}{\tau_1}} - k_{2(t)} e^{\frac{-t}{\tau_2}}$$

La performance dépend alors de 5 paramètres que sont k_1 , k_3 , τ_1 , τ_2 et τ_3 . Les résultats d'une étude conduite sur cycloergomètre montrent une constante de temps τ_3 de la fatigue de l'ordre de 2 jours et de τ_2 (composante négative) d'environ 17 jours. Ce modèle améliore de manière significative le coefficient de détermination (r^2) entre les performances du modèle et les performances réelles comparé aux modèles à 1, 2 ou 3 fonctions de transfert (Busso, 2003).

2.3. Les modèles mixtes

Que ce soit pour la charge d'entraînement ou la performance, il n'existe pas encore vraiment de consensus quant au nombre de mesures nécessaires pour s'assurer d'une solution fiable dans la détermination des paramètres du modèle car ce nombre augmente avec la complexité du modèle (*i.e.* le nombre de paramètres variables) et avec l'importance de la variance résiduelle. Une limitation dans l'application du modèle individuel et des effets de l'entraînement se présente lorsque le nombre recueilli de critères de la performance est relativement faible. Une solution consiste à réaliser alors une analyse globale pour l'ensemble des sujets. Cette méthode permet de tenir compte des variations inter et intra-individuelles, mais également de réduire le nombre d'observations tout en augmentant la robustesse de la détermination des paramètres (Davidian & Giltinan, 1995). Dans cette analyse mixte (mixed-effects model en anglais), certains paramètres sont communs à tous les sujets, et d'autres sont individuels. Ces derniers permettent de prendre en considération la variance interindividuelle. Cette analyse suppose un programme d'entraînement identique pour l'ensemble des sujets.

Avalos et collaborateurs ont appliqué une régression linéaire mixte sur les quantités moyennes d'entraînement des nageurs de haut niveau afin de tenter de repérer les facteurs principaux de la performance (Avalos *et al.*, 2003). L'objectif était donc essentiellement descriptif et ne prenait pas en compte la dynamique des charges journalières d'entraînement. Les effets de l'entraînement sur la performance en compétition étaient étudiés à cours, moyen et long terme. Ce modèle ne comporte pas de fonctions de transferts entre les charges d'entraînement quotidiennes et les variations de performance et se contente de corrélérer des quantités moyennes d'entraînement avec la performance :

$$Y_i = X_i\beta + Z_ib_i + \epsilon_i$$

Dans ce modèle linéaire, Y_i représente les performances du sujet i , $X_i\beta$ est une composante commune à tous les sujets, Z_ib_i est une composante spécifique à chaque sujet i et ϵ_i est un facteur d'erreur aléatoire du modèle. β (fixed effects) représente le gain commun de la réponse à l'ensemble des charges X_i appliquées aux individus. b_i (random effects) représente le gain individuel de la réponse à l'ensemble des contraintes spécifiques Z_i imposées au sujet i . Bien que le modèle ne prenne pas en compte l'effet différé des charges d'entraînement sur les performances, les résultats indiquent des réponses spécifiques

individuelles aux différentes périodes d'entraînement étudiées. De plus, ce modèle aboutit à un degré d'ajustement relativement modeste dans la mesure où les r^2 entre la performance réelle et modèle étaient compris entre 0,15 et 0,66. En d'autres termes, seulement de 15 à 66% des variations de performance à partir des charges d'entraînement étaient expliquées par le modèle. L'intérêt d'un tel modèle par rapport à celui classique de Banister reste à être établi dans la mesure où aucune comparaison directe n'a été réalisée. Sur la base du nombre relativement important de degré de liberté et de la qualité de l'ajustement relativement faible du modèle proposé par rapport aux r^2 couramment rapportés avec le modèle classique, l'apport à nos connaissances demeure apparemment limité. Toutefois, hormis le problème inhérent à la structure même des fonctions de transfert, le principe général d'un modèle mixte semble revêtir un intérêt majeur pour étudier les réponses à l'entraînement d'un groupe homogène soumis au même programme d'entraînement. Ainsi, une autre application d'un modèle mixte a été réalisée plus récemment (Busso & Flück, 2013). Dans cette étude, les auteurs ont élaboré un modèle pour mettre en relation le niveau de transcrits géniques et les réponses à un entraînement en endurance. Les niveaux d'expression de 231 transcrits supposés impliqués dans le remodelage musculaire à l'entraînement en endurance ont été mesurés 1h, 8h et 24h après un entraînement de 6 semaines sur bicyclette ergométrique. Une analyse par cluster a révélé deux groupes de sujets ayant une réponse bien distincte l'un de l'autre avec 45 transcrits retenus pour le groupe 1 et 39 transcrits pour le groupe 2. Les données des 6 sujets ont été analysées ensemble dans un modèle mixte dont la structure repose sur les cinétiques de transcription génique. Les hypothèses formulées étaient (1) au repos, la transcription et la dégradation sont équilibrées, déterminant un état basal des niveaux de transcrits, (2) à l'exercice, cet équilibre est perturbé en faveur de la transcription menant à (3) une accumulation des produits géniques, et (4) l'accumulation des transcrits après exercice provoque des changements dans la dégradation jusqu'à un nouvel équilibre. $D(t)$, vitesse de dégradation d'un transcrit génique à l'instant t , est proportionnel à son niveau d'expression noté $y(t)$ et à son taux de dégradation noté k_d :

$$D(t) = k_d \cdot y(t)$$

Au repos (*i.e.* avant l'exercice), le niveau de transcrit (noté y_{pre}) résulte de l'équilibre entre les vitesses de transcription (T_{pre}) et de dégradation (D_{pre}) génique, qui sont supposées égales :

$$T_{pre} = D_{pre} = k_d \cdot y_{pre}$$

Les variations de T_{pre} à l'exercice sont notées ΔT_{ex} et se dissipent à une vitesse k_a . La variation de l'expression génique induite par l'exercice apparaît avec un délai, noté d . Ainsi, la dynamique de transcription d'un gène i est décrite par l'équation :

$$y(t - d) = 1 - \frac{\Delta T_{ex}^i}{(k_d - k_a)} \cdot e^{k_d/(t-d)} - e^{k_a/(t-d)}$$

Dans ce modèle mixte, les paramètres k_a , k_d et d sont communs pour l'ensemble des groupes de gènes étudiés ΔT_{ex}^i prend n valeurs pour chaque gène i étudié. En prenant en compte les degrés de liberté du modèle, les auteurs ont montré que ce modèle mixte s'appliquait de manière significative ($P < 0,001$) pour les 2 groupes de sujets et les 2 conditions (pre- et post entraînement). Ces résultats montrent qu'un modèle mixte basé sur l'expression de transcrits spécifiques est approprié pour explorer la réponse musculaire à l'entraînement.

2.3. Evolutions vers des modèles physiologiques

Les modèles évoqués précédemment permettent de décrire les variations de performance à partir des charges d'entraînement et celui de Busso et Flück permet, quant à lui, de lier quantitativement les charges d'entraînement aux réponses transcriptionnelles à l'entraînement. Cependant, il n'existe pas encore de modèle physiologique des effets de l'entraînement à proprement parler dans la mesure où la signification biologique des composantes des modèles actuels reste à être clairement établie. Les constantes de temps et d'amplitudes déterminées empiriquement ne possèdent pas encore de fondement physiologique même si plusieurs études ont tenté de relier les profils d'aptitude (FP) et de fatigue (FN) à des mesures biologiques. Ainsi, Banister et Hamilton ont suivi l'évolution du métabolisme du fer à travers la transferrine (protéine sérique responsable du transport du fer de l'intestin vers le foie) et la ferritine (marqueur des stocks de fer) chez des coureuses de fond (Banister & Hamilton, 1985). Ils ont observé des variations concomitantes de niveau de

fatigue, de transferrine et de ferritine. Les niveaux transferrine augmentaient lors des périodes d'entraînement intensif où la fatigue s'accumulait alors que les réserves sériques de fer diminuaient. Ces résultats suggèrent que la surcharge de travail lors de l'entraînement serait à l'origine du développement d'une anémie par manque de fer chez les coureuses de fond. De la même manière, Busso et collaborateur ont mis en regard les variations hormonales et les niveaux des FP et FN chez 6 haltérophiles de haut niveau durant un an (Busso *et al.*, 1990). Les niveaux de testostérone ainsi que les variations du ratio testostérone/cortisol étaient corrélés au niveau de la FP déterminée par le modèle. Ces données montrent que les résultats du modèle peuvent être reliés à des paramètres biologiques, mesurés indépendamment de ce dernier. Cependant, les niveaux de testostérone et son ratio sur cortisol étaient également liés aux niveaux de la FN. Ce résultat est paradoxal dans la mesure où la fatigue est supposée être liée à une diminution de l'activité anabolique, le niveau de testostérone étant inversement liée au stress physiologique (Häkkinen *et al.*, 1988). En fait, ce résultat révèle une limite du modèle empirique des effets de l'entraînement formulé par Banister. Les deux fonctions antagonistes d'aptitude et de fatigue représentent chacune l'image de l'autre en miroir, leur constante de temps étant relativement proche l'une de l'autre, ce qui n'apparaît pas cohérent avec la réalité physiologique. Une explication serait que FP et FN varient de façon concomitante car leur structure mathématique repose sur la même fonction de premier ordre (Busso *et al.*, 1990). Chez des coureurs à pied, de fortes corrélations significatives ont été observées d'une part entre FP et la vitesse de course correspondant au seuil ventilatoire et d'autre part entre FN et l'item de fatigue du questionnaire POMS (Wood *et al.*, 2005) sans pour autant que les problèmes évoqués précédemment ne soient résolus. Si bien qu'au total, les tentatives qui ont été menées pour relier FP et FN à des paramètres biologiques se sont heurtées à un problème majeur : FP et FN sont en réalité toutes deux étroitement corrélées. La conséquence est que les paramètres biologiques sont corrélés à la fois à l'aptitude et à la fatigue. Afin d'éviter cet écueil et pour évoluer vers un modèle dont ces constituants puissent revêtir une signification biologique, Busso et collaborateurs ont proposé une formulation mathématique sensiblement nouvelle pour l'aptitude et la fatigue au travers des influences positives (IP) et négatives (IN) de l'entraînement sur la performance chez des haltérophiles de haut niveau (Busso *et al.*, 1992) :

$$E(i/n) = k_1 w_i e^{-\frac{(n-i)}{\tau_1}} - k_2 w_i e^{-\frac{(n-i)}{\tau_2}}$$

Les valeurs des IP et IN au jour n sont estimées à partir de la somme des influences positives ou négatives de chaque charge d'entraînement passée :

$$IN_n = \sum_{i=1}^{n-1} |I(i/n)|, \text{ quand } E(i/n) < 0.$$

$$IP_n = \sum_{i=1}^{n-1} |I(i/n)|, \text{ quand } E(i/n) > 0.$$

De cette manière, la performance au jour n devient $\hat{p}_n = IP_n - IN_n$.

Ainsi, lorsque l'on observe la réponse impulsionnelle à une charge d'entraînement, la performance diminue dans un premier temps puis retrouve son niveau initial avant de le dépasser (cf partie 2.1). IN correspond à la première période où la performance est inférieure à son niveau initial et IP correspond à la période suivante où la performance dépasse son niveau initial. Dans la même étude, les auteurs ont examiné les corrélations existant entre les paramètres hormonaux et IP et IN. Les changements d'IP pendant les 4 semaines d'entraînement intensif étaient corrélés aux variations du taux circulant de LH en réponse à une diminution du taux de testostérone dans le sang. Ces résultats suggèrent que l'amplitude de la réponse hypothalamo-hypophysaire à un entraînement intensif pouvait jouer un rôle dans les capacités de récupération et d'adaptation des athlètes. Une étude réalisée chez des nageurs révèle de fortes relations entre l'activité du système nerveux parasympathique (SNP) appréciée au travers de la variabilité de la fréquence cardiaque, la performance et IN (Chalencon *et al.*, 2012). La corrélation entre la performance et l'index d'activité du SNP est comprise entre 0,55 et 0,80. Par ailleurs, et de manière surprenante, la performance est également étroitement liée à l'IN. Cette forte corrélation semble expliquée par le fait que les gains de performance à l'entraînement sont dus principalement à une diminution de l'IN plutôt qu'à une augmentation de l'IP. Cependant, les IP et IN de l'entraînement sur l'activité du système parasympathique varient dans le même sens lors des périodes d'entraînement intense et les périodes de récupération. Ces variations synchrones soulignent une fois de plus la limite du modèle, liée à la structure même de ce dernier.

3. Validité des modèles

3.1. Ajustement des paramètres du modèle

Pour s'approcher d'un ajustement optimal entre les variations de performance réelles et celles prédites par le modèle, les paramètres du modèle peuvent varier librement. Classiquement, leur détermination est obtenue par la méthode des moindres carrés. Je décrirai également une autre méthode, celle des algorithmes génétiques, que nous avons employée dans l'étude 3 réalisée durant ma thèse, qui est moins répandue mais qui présentent néanmoins l'avantage d'éviter le problème des minimums locaux.

3.1.1. La méthode des moindres carrés

Dans la méthode des moindres carrés, les paramètres sont modifiés par itérations successives jusqu'à obtenir une valeur minimale de la somme des carrés résiduels (RSS) entre les performances modèles et réelles :

$$RSS = \sum_{n=1}^n (p_n - \hat{p}_n)^2$$

Où n prend N valeurs correspondant aux jours où la performance réelle est mesurée. Lorsque la RSS la plus faible est obtenue, la qualité de l'ajustement du modèle est mesurée par le coefficient de détermination (r^2) entre la performance réelle et modèle. Il indique le pourcentage de variance totale de la performance expliquée par le modèle :

$$r^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS}$$

Où RSS est la somme des carrés résiduels et TSS la somme totale des carrés. La signification statistique de l'ajustement est estimée à partir de l'analyse de la variance des résidus (test F de Fisher) (Motulsky & Ransnas, 1987). L'homoscédaticité et la normalité des résidus sont un prérequis de l'analyse statistique (Hellard *et al.*, 2005). Les résidus doivent être répartis aléatoirement autour de la variable étudiée (le temps ou les charges d'entraînement dans notre cas). Ainsi, par régression linéaire des résidus autour de la variable, on peut déterminer si la structure du modèle est appropriée ou susceptible de nouvelles améliorations.

L'erreur standard moyenne (ESM) est définie par :

$$ESM = \frac{\sqrt{RSS}}{N - ddl - 1}$$

Où N est le nombre de mesures de la performance réelle, ddl est le nombre de degrés de liberté du modèle et RSS est la somme des carrés résiduels. ESM a été utilisée comme indicateur de précision des estimations des performances par le modèle (Morton *et al.*, 1990; Busso *et al.*, 1994, 1997, 2002; Busso, 2003; Hellard *et al.*, 2006). La détermination des constantes de temps pose un problème dans la mesure où, avec la méthode des moindres carrés, l'existence de minimums locaux limite l'exploration des différentes possibilités numérique théoriquement offertes au système. Une façon de contourner partiellement cette source d'erreur consiste à réitérer la minimisation des résidus avec des valeurs de départs bien distinctes les unes des autres afin de tenter d'enjamber les minimums locaux et explorer ainsi un plus large éventail de solutions. Une méthode alternative plus élégante est possible.

3.2.2. La méthode des algorithmes génétiques

Généralités

Les algorithmes génétiques (AG) sont des algorithmes évolutionnaires (Beasley, Bull, & Martin, 1993a,b) utilisés pour optimiser des variables. Le principe est de simuler l'évolution d'une population d'individus auxquels on applique différents opérateurs génétiques (croisements, mutations) et que l'on soumet à une sélection à chaque génération. Surtout utilisés pour l'optimisation de systèmes industriels évoluant dans le temps (centrale nucléaire, chaîne de production, optimisation d'emplois du temps) ils trouvent également des applications dans l'optimisation de systèmes biologiques comme la mise en place de réseaux neuronaux efficaces lors de l'apprentissage (Renders, 1995). Les AG sont inspirés du concept de sélection naturelle élaboré par Charles Darwin si bien que le vocabulaire employé est directement calqué sur celui de la génétique et de la biologie. Bien qu'il n'existe pas de preuve générale de l'efficacité des AG, l'efficacité de la sélection naturelle dans le monde du vivant apparaît comme une évidence. L'évolution des espèces a permis l'émergence d'organismes parfaitement adaptés à leur environnement. Les AG sont conçus selon le même principe que ce processus d'évolution. Les AG combinent la théorie de l'évolution à la génétique moderne introduite par Mendel. La théorie de l'évolution est

simple et basée sur la volonté naturelle de survie de l'espèce. Un individu naît avec un caractère individuel, qui n'est fondamentalement ni un avantage, ni un inconvénient, mais qui le devient selon l'environnement. Dans le cas où ce caractère est un avantage, l'individu a plus de chance de se reproduire (croisement) et de le transmettre à la génération suivante, c'est l'hérédité. A cela vient s'ajouter les mutations spontanées qui vont introduire un nouveau caractère original. De la même manière, la transmission de ce nouveau caractère à la génération future sera favorisée s'il présente un avantage. A chaque nouvelle génération, un individu possèdera ainsi les caractères hérités, et les caractères issus de mutations spontanées (et aléatoires), s'il y en a. Au fil des générations, l'espèce s'adapte ainsi à son environnement. De fait, la solution n'étant pas optimale dès la première série de calcul (première génération), 200 nouveaux gènes enfants, générés à partir des premiers gènes parents, sont testés, et ainsi de suite pendant 200 générations, jusqu'à ce que le processus converge vers solution optimum local et stable (**figure 3**). Les AG ne permettent pas de converger vers une solution analytique ou vers une approximation numérique mais de trouver des solutions satisfaisant au mieux différents critères imposés, d'ailleurs souvent contradictoires. Dans notre cas, les AG nous permettent de tester une très large étendue de combinaisons de variables afin de déterminer de façon fiable les constantes de temps des modèles des effets de l'entraînement.

Figure 3 : Organigramme des algorithmes génétiques. Il consiste en la genèse d'une population (variables) que l'on soumet à une sélection et à laquelle on applique différents opérateurs (croisements, mutations) à chaque génération. Si la sélection s'opère à partir d'une fonction d'adaptation, alors la population tend à s'améliorer (Bäck, 1996). L'algorithme ne nécessite aucune connaissance du problème, il se contente de manipuler les entrées (variables), lire les sorties, puis manipuler à nouveau les entrées pour améliorer les sorties (Whitley, 1993). La figure est tirée de la thèse de Vincent Magnin (Magnin, 1998).

Principe

Dans le but de comprendre le fonctionnement des AG, je vais appliquer la méthode à notre contexte d'entraînement, sur le modèle de Banister et nous nous servirons des AG pour en optimiser les constantes de temps. Un AG nécessite généralement la définition d'une fonction rendant compte de la pertinence des solutions potentielles, à partir des grandeurs à optimiser. Il s'agit de la fonction d'adaptation f . Dans le cas du modèle de Banister, la fonction f est définie par la performance modèle (issue de la balance aptitude / fatigue). Ici, l'objectif de la fonction f est unique et consiste en l'obtention d'une performance modèle la

plus proche possible de la performance réelle. Dans le cadre de mes recherches, nous avons optimisé la fonction f par la méthode des moindres carrés, pour obtenir une RSS minimal entre les performances modèles et réelles.

La construction d'un AG nécessite plusieurs étapes. La première étape consiste en le codage des variables. Par analogie avec le code génétique, nos variables (τ) sont nommées gènes et sont codées en langage binaire. Dans ce langage, il n'existe que deux valeurs, 0 et 1 appelées bit. Pour un codage en 8 bit, chaque τ est remplacé par un entier long constitué d'un ensemble de 8 "0" et "1". Par exemple, le 7 et 22 s'écrivent respectivement 000001111 et 00010110 en langage binaire. La discrétisation des intervalles aboutit à une population de 2^8 variables discrètes x_i inscrites dans un espace de recherche fini allant de $x_{i \min}$ à $x_{i \max}$. La fonction f est calculée à partir des variables générées. Les variables qui donnent les meilleurs résultats sont retenues (génération intermédiaire). Pour nous, ils correspondent aux variables qui déterminent une RSS le plus faible entre la performance réelle et la performance modèle (fonction f). Cette génération intermédiaire est deux fois plus petite ($N/2$ composants) que la génération dont elle est issue. Notre algorithme étant conçu de façon à ce que chaque couple de gènes parents donne naissance à 2 gènes enfants, nous aboutissons à une génération équivalente (N composants) à l'instant $t + 1$ par croisements et mutations (**figure 4** en haut).

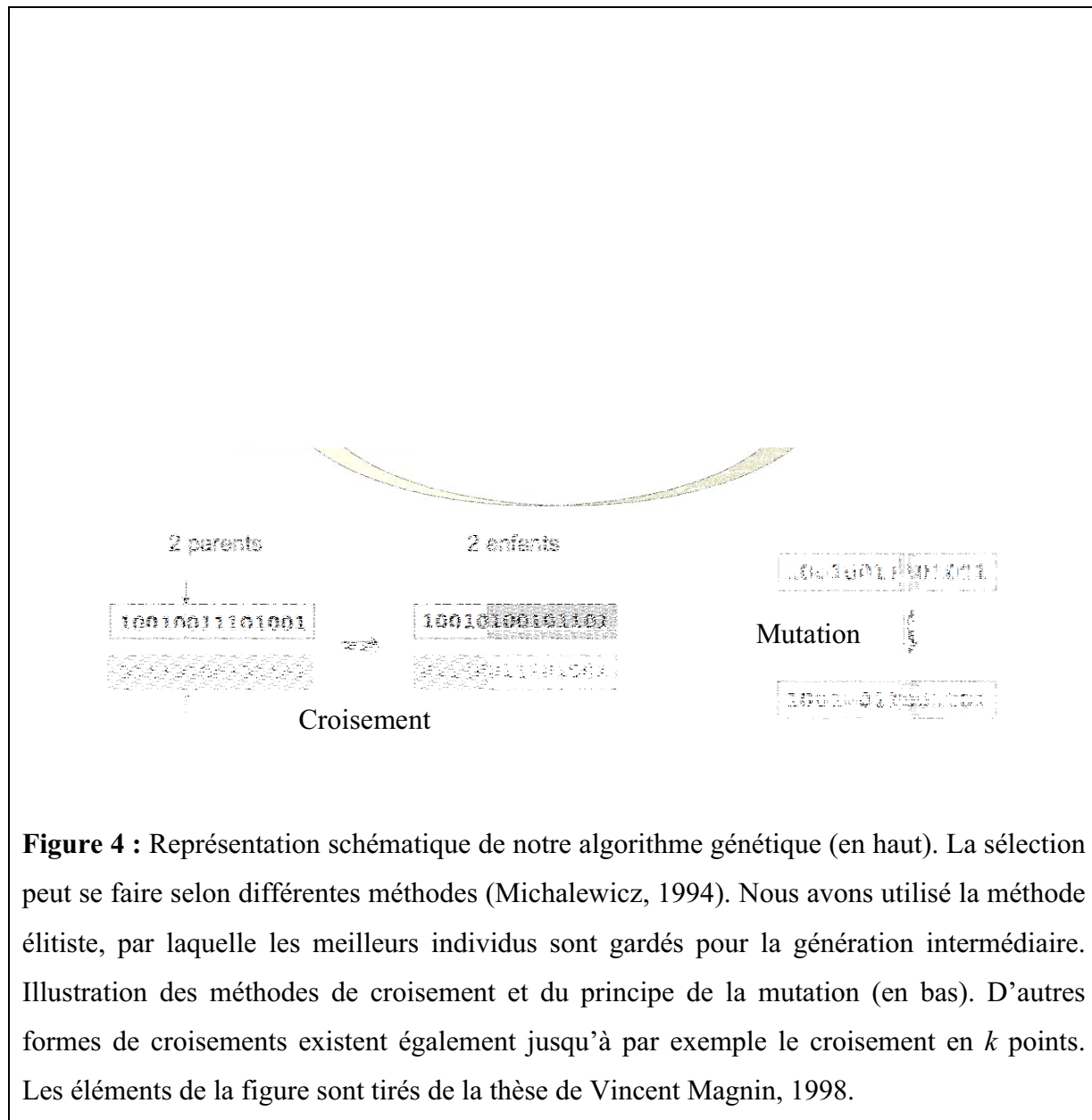


Figure 4 : Représentation schématique de notre algorithme génétique (en haut). La sélection peut se faire selon différentes méthodes (Michalewicz, 1994). Nous avons utilisé la méthode élitiste, par laquelle les meilleurs individus sont gardés pour la génération intermédiaire. Illustration des méthodes de croisement et du principe de la mutation (en bas). D'autres formes de croisements existent également jusqu'à par exemple le croisement en k points. Les éléments de la figure sont tirés de la thèse de Vincent Magnin, 1998.

Le croisement peut se faire en un ou en plusieurs points (**figure 4** en bas). Il est classiquement admis que les croisements en deux points sont les plus efficaces (Beasley *et al.*, 1993b). L'introduction de mutations n'est pas systématique. Ces dernières sont définies comme le changement d'un bit sur le gène. La probabilité de mutation par bit est le plus souvent fixée entre 0,001 et 0,01. Les mutations permettent de sortir d'une impasse lorsque l'algorithme de résolution reste coincé dans un minimum local et de s'assurer qu'un grand nombre de possibilité soit testé garantissant ainsi que la solution optimale soit atteinte.

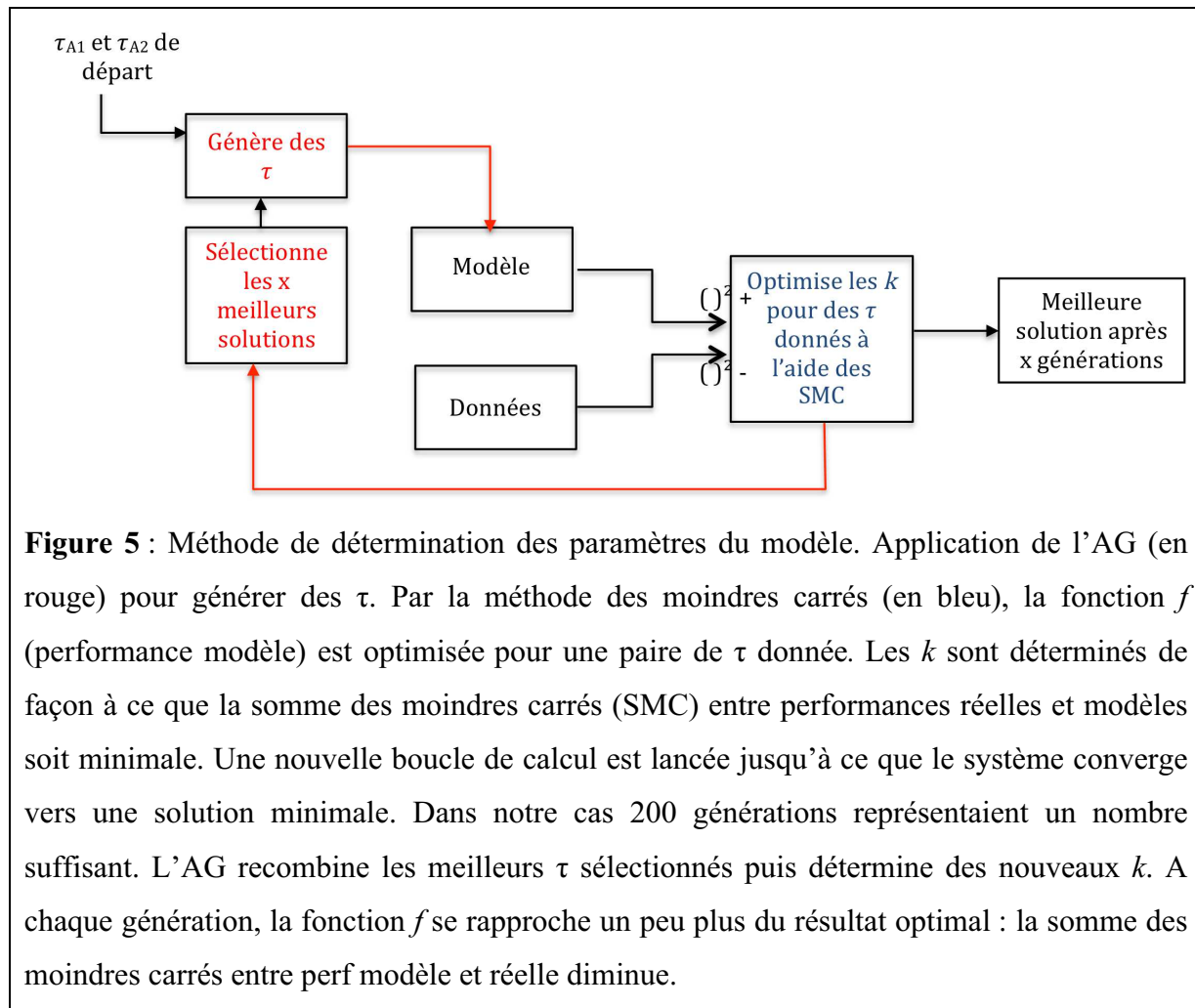
La nouvelle génération de gènes $t + 1$ s'approche un peu plus de la solution que la génération précédente. Le processus est réitéré jusqu'à la solution optimale, celle qui produit la somme des moindres carrés la plus faible et satisfait les contraintes imposées.

Intérêt et paramétrage

La convergence d'un AG vers la solution optimale nécessite un grand nombre de générations, et donc un large temps de calculs. Un des intérêts des AG est que le temps de calcul ne croît pas exponentiellement avec le nombre n de gènes (*i.e.* variables) mais plutôt en $n \times \ln n$, ce qui indique un accroissement quasi linéaire du temps de calcul. D'autre part, ce temps de calcul est proportionnel à la complexité de la fonction d'adaptation, c'est à dire de la performance modèle dans notre cas. Le choix de la taille de la population caractérisée par le nombre de valeurs testées est capital. Une population trop faible convergera vers un optimum local peu intéressant et une population trop large nécessitera des calculs trop longs. La taille de la population dépend donc de la puissance de calcul dont on dispose, des méthodes utilisées (sélection, fréquence des mutations etc), du nombre de variables et de la fonction d'adaptation utilisée. Par exemple, dans le cas du modèle de Banister, nous avons choisi une population composée de 12 individus (12 rongeurs dans notre cas) et le chromosome comprend 2 gènes (2 constantes de temps). La taille de la population était de 200 valeurs par gènes codées en 8 bits et cela sur 200 générations. Le choix d'appliquer l'algorithme sur 200 générations nous a semblé être un bon compromis le temps de calcul (une nuit) et la vitesse de convergence vers la solution minimale.

Application à la modélisation de l'effet de l'entraînement sur la performance

Dans le cadre de mes travaux de recherche, nous avons combiné les algorithmes génétiques, avec la méthode classique des moindres carrés. Nous sommes partis du postulat qu'une population homogène qui suit le même entraînement, produit une performance stable. En d'autres termes, les individus répondent de manière similaire à l'entrée du système, avec néanmoins une variabilité inter individuelle liée à des facteurs externes ou motivationnels. Chaque individu répond avec une amplitude individuelle, mais avec des constantes de temps propres aux groupes. Cela se traduit par des constantes d'amplitudes individuelles (k) et des constantes de temps communes (τ). Ce modèle mixte présente ainsi les avantages énoncés dans la partie 2.3. comparé aux modèles simples. Les constantes d'amplitudes ont été déterminées par la méthode des moindres carrés et les constantes de temps par AG. La **figure 5** résume simplement cette approche combinée.



3.2. Légitimité des modèles à complexité croissante : Le gain de variance

La qualité de l'ajustement qui peut être appréciée notamment au travers du coefficient de détermination, le r^2 , qui est nécessairement liée au nombre de degrés de liberté (ddl) du modèle. L'ajout dans le modèle d'un ou plusieurs paramètres est généralement associé à une augmentation du r^2 sans pour autant que les nouveaux termes introduits soient significatifs (**figure 6**). Dans le cas du modèle classique de Banister, les ddl sont au nombre de 4 (*i.e.* 4 paramètres variables que sont les deux constantes de temps et les deux constantes d'amplitudes pour les fonctions d'aptitude et de fatigue). Ce nombre de ddl peut augmenter rapidement dans le cas de modèles mixtes. Par exemple, l'application du modèle de Banister à 10 sujets avec des constantes de temps communes donne 22 ddl (10 sujets x 2 constantes d'amplitudes individuelles + 2 constantes de temps communes = 22 ddl). Ainsi, la qualité de l'ajustement de modèles à ddl différents ne peut pas être opérée sur la base de comparaison

des simples r^2 . Pour comparer deux modèles à complexité différente, il faut donc au préalable prendre en compte le nombre de ddl dans le calcul de r^2 :

$$r_{adj}^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS} \cdot (ddl - 1)$$

Où la RSS est la somme des carrés résiduels et TSS est la somme totale des carrés.

Selon le principe de parcimonie, un modèle n'est retenu que s'il améliore de manière significative la qualité de l'ajustement par rapport à un modèle à complexité moindre (Busso *et al.*, 1991). En d'autres mots, le gain de variance obtenu par un modèle plus complexe doit être significatif. Ainsi, l'application du modèle de Calvert à 3 composantes (Calvert *et al.*, 1976) requiert en toute rigueur une analyse de gain de variance par rapport au modèle classique à deux composantes et une comparaison des r^2 ajustés (Busso *et al.*, 1991; Busso, 2003). En accord avec cette règle, les données recueillies lors d'un entraînement sur cycloergomètre ont été analysées à la lumière de modèles à complexité croissante et les r^2 ajustés de ces modèles ont été comparés (Busso, 2003). Les résultats montrent que dans ces conditions expérimentales, le modèle à fatigue variable (à 5 paramètres) améliore l'ajustement des paramètres de manière significative comparé aux autres modèles testés (modèle à simple fonction de transfert et 2 paramètres, modèle de Banister à 2 fonctions de transfert et 4 paramètres, et modèle de Calvert à 5 paramètres).

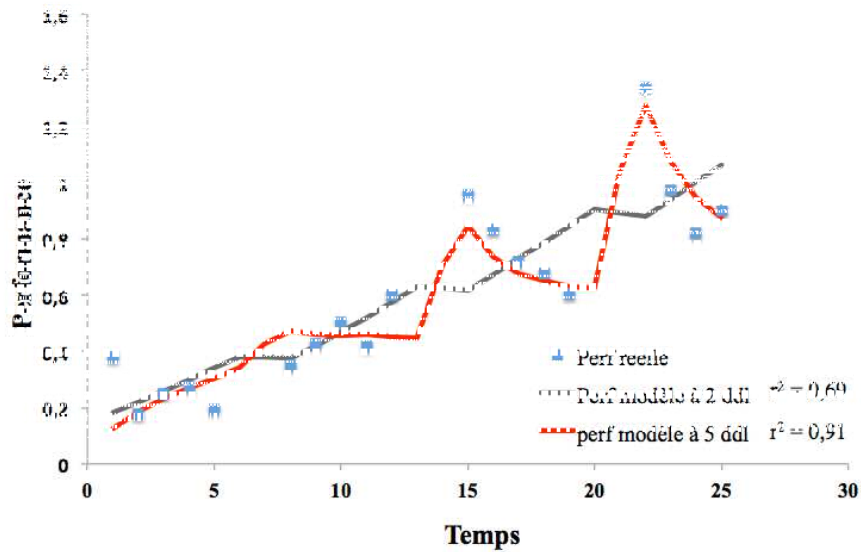


Figure 6 : Exemple d'ajustement de 2 modèles à complexité différente, à partir des mêmes données. La performance est exprimée en fonction du temps (unités arbitraires). La performance réelle (marques bleues) est mesurée. La performance du modèle comportant une simple fonction de transfert soit un total de 2 ddl est représentée par une ligne grise et celle du modèle à fatigue variable comportant 5 ddl, est représentée par la courbe rouge. Dans cet exemple, le modèle à fatigue variable (rouge) décrit manifestement d'une manière plus précise la performance réelle ($r^2 = 0,91$) que le modèle une simple fonction de transfert (gris ; $r^2 = 0,69$). Une comparaison directe de ces r^2 n'est pas appropriée dans la mesure où ils doivent être réajustés au nombre de ddl (r^2_{adj}) pour pouvoir estimer le gain de variance éventuel entre les 2 modèles. Ici, le gain de variance est significatif et le modèle à 5 paramètres peut être retenu.

4. Apport de la modélisation dans le domaine de l'entraînement et de la physiologie

La modélisation de phénomène naturel présente des applications dans de nombreux domaines. Elle permet d'analyser des phénomènes réels et de fournir des prévisions. Le modèle est nourri grâce à des données expérimentales. A l'échelle de l'univers, l'observation du mouvement des planètes permet d'établir des modèles de prédiction de collisions ou de formation de systèmes solaires. A l'échelle planétaire, il est possible de prédire les phénomènes météorologiques qui vont se succéder les jours à venir. A l'échelle humaine, l'analyse des flux sanguins a permis de dessiner les bases du développement et la transplantation de cœurs artificiels chez des patients insuffisants cardiaques. En physiologie de l'exercice, la modélisation représente un outil qui présente deux grands types d'application. La modélisation autorise en premier lieu des procédures de simulation des effets de l'entraînement dans le but d'optimiser les programmes. En second lieu, elle permet de lier quantitativement les principales adaptations biologiques à la dynamique des charges d'entraînement.

4.1. Optimisation de la performance

L'application du modèle de Banister sur les données recueillies à partir de 18 nageurs de niveau national et international sur une période de 44 semaines a montré l'importance de la fine régulation des charges d'entraînement (Mujika *et al.*, 1996). Dans cette étude, l'analyse des IP et IN indique que la période d'affûtage permet un gain de performance par réduction de l'IN avant une compétition, sans réduire l'IP. Ces résultats illustrent bien l'intérêt de la modélisation des effets de l'entraînement. Des simulations de différentes stratégies d'affûtage (réduction de la charge exponentielle ou par palier) ont été réalisées à partir de données issues de l'étude de Banister et Hamilton (Banister & Hamilton, 1985) dans le but d'optimiser la période d'affûtage (Banister *et al.*, 1999). Une réduction rapide ($\tau = 4$ jours) permettrait de meilleurs gains de performance comparé à une réduction plus lente ou une réduction en palier. Ces résultats ont été confirmés dans la même étude par leur comparaison avec des résultats expérimentaux issus de triathlètes.

La durée de la période d'affûtage a également pu être optimisée par l'utilisation des modèles. A partir des paramètres du modèle, des caractéristiques de la période d'affûtage

ont été développées (Morton *et al.*, 1990; Fitz-Clarke, Morton, & Banister, 1991). Le temps nécessaire à la récupération des charges d'entraînement (t_n) et le temps nécessaire pour que l'entraînement soit bénéfique (t_g) sont calculés par Fitz-Clarke et collaborateurs (Fitz-Clarke *et al.*, 1991) selon les relations (**figure 2**) :

$$t_n = \frac{\tau_1 * \tau_2}{\tau_1 - \tau_2} * \ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) \quad \text{et} \quad t_g = \frac{\tau_1 * \tau_2}{\tau_1 - \tau_2} * \ln\left(\frac{k_1 \tau_1}{k_2 \tau_2}\right)$$

Si la durée optimale de la période d'affûtage a pu être proposée comme étant comprise entre t_n et t_g (Fitz-Clarke *et al.*, 1991), il n'en demeure pas moins que cette dernière doit nécessairement être plus longue que t_g dans la mesure où t_g représente le temps nécessaire pour atteindre une performance maximale en l'absence de nouvelle charge d'entraînement. Or la réalité de l'entraînement même en période d'affûtage est un entraînement quotidien/biquotidien pour les athlètes de haut niveau. Le temps pour l'atteinte de la performance maximale est nécessairement différé par rapport à t_g . A partir des données issues de l'étude de Hamilton et Banister, t_n et t_g prennent les valeurs de 15 jours et 40 jours respectivement (Banister & Hamilton, 1985). Ces résultats sont très proches de ceux obtenus chez les nageurs pour lesquels t_n et t_g sont estimés à 12 ± 6 jours et 32 ± 12 jours, respectivement (Mujika *et al.*, 1996).

Il est important d'interpréter les résultats dans leur contexte et de porter un regard critique sur les modèles employés et sur les populations d'athlètes étudiés. Le modèle classique de Banister comporte quelques approximations trop marquées pour être appliqué sur un entraînement très contrasté comme celui suivi par les athlètes de haut niveau. Le modèle prévoit en effet des gains de performance qui augmentent linéairement avec les charges d'entraînement alors que la réalité de l'entraînement chez les athlètes élités est tout autre. Cette limite est inhérente à la structure même du modèle de Banister qui suppose que les paramètres sont constants, et par conséquent, t_n et t_g également, quelle que soit la charge d'entraînement. Or, les données de la littérature semblent indiquer que t_n et t_g varient sous l'effet de la charge, de fait, les paramètres aussi (Busso *et al.*, 1997; Kenttä & Hassmén, 1998; Kubukeli, Noakes, & Dennis, 2002). Ces observations justifient l'intérêt du modèle à k_2 variable (Busso, 2003) qui s'approche un peu plus d'une réalité physiologique d'entraînement et qui explique pourquoi t_g doit être plus long que la durée de la période d'affûtage. Ce modèle déjà évoqué permet d'établir une relation en forme de U-inversé entre la dynamique des charges d'entraînement et la performance (**figure 7**). Cette relation illustre

le caractère non linéaire du modèle de Busso et semble cohérent avec les données sur l'entraînement et le surentraînement qui prévoit une diminution de la performance lors de l'augmentation excessive de la charge d'entraînement (Kuipers, 1998). Il existe une charge d'entraînement optimale (W_{opt}) au-delà de laquelle la performance est impactée transitoirement de façon négative (Busso, 2003) :

$$W_{opt} = \frac{k_1 e^{-t/\tau_1} (1 - e^{-t/\tau_2}) (1 - e^{-t/\tau_3})}{2k_3 (1 - e^{-t/\tau_1}) e^{-t/\tau_2}}$$

Figure 7 : Relation en forme de U-inversé entre la charge d'entraînement quotidienne et le niveau de performance, selon le modèle à k_2 variable. La prise en compte de la dynamique des charges dans le modèle à k_2 variable reflète le caractère non linéaire de ce modèle comparé au modèle de Banister, selon lequel des paramètres sont constants au cours de la période d'entraînement, quelle que soit la charge. La figure est tirée de la thèse de Luc Thomas (Thomas, 2009).

W_{opt} permet d'examiner les facteurs de l'entraînement qui pourraient affecter l'efficacité de la période d'affûtage (Thomas & Busso, 2005). Si la charge est supérieure à W_{opt} , la performance atteint un niveau inférieur à P_{opt} et le temps de récupération (t_n) est majoré (Busso, 2003). Des simulations de réponse à l'entraînement ont été réalisées à partir de données de 6 sujets obtenues lors d'une étude antérieure dans laquelle les sujets réalisaient

un exercice intermittent sur cycloergomètre (Thomas & Busso, 2005). Les résultats montrent la nécessité de réduire de manière plus importante la charge durant l'affûtage, si elle est précédée d'une période de surcharge à 120% de W_{opt} (réduction de la charge de 30,8 % pendant 19,3 jours et de 39,3 % pendant 28 jours, avec et sans période de surcharge préalable, respectivement). Ainsi, les gains de performance sont plus importants lorsque la période d'affûtage est précédée d'une période de surcharge. Ces résultats obtenus à partir de données d'athlètes entraînés en endurance sont comparables à ceux obtenus chez des gymnastes de haut niveau. Les simulations de programmes d'entraînement chez ces gymnastes indiquent que la performance est stabilisée lorsque les athlètes travaillent à W_{opt} (durant 600 jours). En période préparatoire, une période de surcharge à 120% de W_{opt} durant 4 semaines, suivie d'une période d'affûtage de 34 jours à 52% de W_{opt} , déterminent des gains de performance optimaux (Sanchez *et al.*, 2013). Ces résultats sont en accord avec les résultats des études sur la période d'affûtage qui suggèrent une réduction de la charge de 40-60% dans les activités d'endurance, et particulièrement en cyclisme et natation (Neary, Bhambhani, & McKenzie, 2003; Bosquet *et al.*, 2007). W_{opt} serait donc le premier élément à prendre en compte pour ensuite optimiser la durée et l'amplitude de la période d'affûtage. Par ailleurs, il semblerait également que les gains de performance soient liés essentiellement à une dissipation de la fatigue accumulée dans la période de surcharge (**figure 8**) mais également et dans une moindre mesure à l'atteinte de l'IP à un plateau (Busso, 2003).



Figure 8 : Evolution de la performance au cours de 15 semaines d'entraînement (en haut) et expression des influences positive (IP) et négative (IN) durant cette même période (en bas). Le programme d'entraînement est composé de 2 phases distinctes : Une phase avec 3 séances d'entraînement par semaines (semaines 1 à 9) et une phase avec 5 séances par semaine (semaines 10 à 13). On voit une augmentation de l'IN avec l'intensification de la charge d'entraînement, concomitante avec l'arrivée de la performance à un plateau (à partir de la semaine 10). La figure est tirée de l'étude de Busso, 2003.

Le modèle à k_2 variable a permis de mettre en lumière l'importance de l'alternance des périodes chargées et allégées durant un programme d'entraînement mais également de caractériser ces périodes grâce notamment à l'utilisation de W_{opt} , de t_g et de t_n . Cependant dans cette approche, le processus d'entraînement est toujours assimilé à une boîte noire. Or l'objectif souvent évoqué dans les travaux porte sur la compréhension des mécanismes responsables de ces gains de performance, *i.e.* des adaptations musculaires, nerveuses etc. Dans cette perspective le recours au modèle animal peut se révéler précieux. L'application de la théorie des systèmes dans un contexte plus large pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse sur les mécanismes adaptatifs sous-jacents à la performance.

4.2. Caractérisation des mécanismes sous-jacents à la performance : Les limites de l'athlète

La modélisation des effets de l'entraînement est un outil puissant pour l'optimisation de la performance à travers le paramétrage du programme d'entraînement. Jusqu'à présent, toutes les études ont appliqué la théorie des systèmes à l'athlète, quelle que soit la discipline sportive. Cependant, le sportif comme moyen d'étude présente de nombreuses limites, tant sur le plan pratique que sur le plan éthique.

Recueil des données

Comme évoqué précédemment, un modèle nécessite une quantification précise des charges d'entraînement comme des performances. De plus, le nombre de mesures de performance et leur fréquence revêtent une importance capitale pour une détermination fiable des paramètres des modèles (Stevens, 1986). Ce recueil de mesures est difficilement accessible directement compte tenu du nombre faible de compétitions réalisé par un athlète en une saison. De plus, selon la discipline sportive, la quantification de la performance représente déjà une difficulté en soit. C'est le cas par exemple des sports d'opposition où le niveau de l'adversaire n'est pas connu de façon précise, excepté à un niveau de pratique international (classement ATP au tennis par exemple). Les modèles utilisés sont nécessairement basés sur une simplification de la réalité dans la mesure où la performance est le résultat uniquement des charges d'entraînement (Banister *et al.*, 1975). En réalité, des facteurs psychologiques comme le stress en compétition, la qualité du sommeil, la fatigue générée par les déplacements et les décalages horaires, déterminent évidemment quelques variations de performance, indépendamment de la charge d'entraînement (Wood *et al.*, 2005; Pyne, Mujika, & Reilly, 2009; Hagin *et al.*, 2012). Ces facteurs environnementaux ne sont généralement pas contrôlés, ni même mesurables, et génèrent une variabilité de réponses au sein de sujets d'une étude qui suivent un protocole similaire. Même si l'utilisation des modèles mixtes a permis de prendre en compte dans une certaine mesure le bruit lié aux facteurs non contrôlés, les variations intra individuelles, même discrètes dans la performance, ont une grande influence sur la qualité de l'ajustement d'un modèle et dans la détermination de ses paramètres.

La précision des mesures revêt une importance particulière lorsque le niveau de pratique sportive est élevé, car une faible variation de performance peut avoir un impact important sur le classement final d'une compétition (Hopkins, Hawley, & Burke, 1999; Mujika & Padilla, 2003).

Mise en situation

Une alternative pour limiter les variations inter et surtout intra individuelles lors du recueil de données serait de recourir à un modèle d'entraînement sur l'animal afin de limiter l'influence de paramètres externes. Les lignées de rongeurs sont contrôlées précisément ce qui limite déjà la variabilité inter individuelle de type génétique. D'autres facteurs comme l'âge et l'alimentation sont également contrôlables comparé à l'athlète comme sujet d'étude. Ainsi, la reproductibilité des mesures et des réponses à l'entraînement est d'autant plus grande. Le choix du rongeur comme modèle d'étude présente en outre un avantage pour des investigations biologiques détaillées. Les études citées portant sur la programmation de l'entraînement montrent clairement l'importance d'une alternance de périodes de surcharge et d'affûtage. Aussi, un entraînement contrasté au sein duquel la surcharge et l'allègement des charges sont très importants, détermine des gains de performance supérieurs par rapport à un entraînement où l'écart de charge entre ces deux périodes est plus faible (Thomas & Busso, 2005; Sanchez *et al.*, 2013). L'application de la théorie des systèmes sur l'animal autorise une plus grande liberté sur la fourchette des charges imposables. D'un point de vue pratique, il n'est pas possible de soumettre un athlète à un entraînement trop intense qui augmente le risque de contre-performance et de blessures. Chez l'animal, il est possible d'étudier la réponse à des charges de travail plus importantes et surtout mieux standardisées que chez l'Humain mais également de tester de nombreuses combinaisons dans la quantité et la durée des charges au sein de périodes de surcharges et d'affûtage. Cette possibilité de contraster les périodes d'entraînement favorise les chances d'observer un effet marqué de l'entraînement sur la performance. L'intérêt ici est de pouvoir ensuite étudier l'animal par les techniques de laboratoire pour tenter de comprendre les adaptations physiologiques à l'origine des variations de performances. Par exemple, la possibilité de générer des lignées génétiques spécifiques permet la détermination de facteurs liés à la performance, l'analyse histologique permet de caractériser un muscle (taille et types des fibres, shift, tension spécifique, métabolisme énergétique...) dans des détails que ne seraient pas envisageables chez l'Humain.

De plus, la quantification des charges et performances à partir d'animaux entraînés en

laboratoire est également plus précise comparé à des athlètes sur le terrain. Les tests de VMA, les cages métaboliques, les tapis roulants sont autant d'outils qui permettent des mesures précises qui ne laissent que peu de place aux incertitudes. La mesure d'une charge levée sur une distance connue par un rat est mesurable facilement et reflète un travail réel réalisé par l'animal comparé à un RPE fourni par l'athlète lui-même à la fin de sa séance d'entraînement, et qui relève d'une appréciation subjective (qui peut être biaisé par exemple par la nécessité d'apparaître en forme aux yeux de l'entraîneur ou du sélectionneur afin de participer effectivement aux événements d'importance à venir).

Objectifs

Bien qu'encore essentiellement empirique, la modélisation des effets de l'entraînement sur la performance a permis de grandes avancées dans le domaine de la préparation en vue d'une compétition. Une fois l'étape préliminaire de la quantification de la charge de travail et de la performance réalisée, le modèle choisi peut être appliqué et ses paramètres ajustés. Cependant, selon le contexte, l'expérimentateur peut être confronté à diverses limites. Dans le cadre de mes travaux de recherche sur la modélisation des effets de l'entraînement sur la performance, nous avons, à travers 3 études, tenté de repousser ces limites, selon le contexte d'application.

Ainsi, nous avons commencé par proposer une méthode de quantification de la charge d'entraînement et de la performance dans une activité d'opposition. Pour cette étude 1, il a fallu développer un index de performance indépendant des résultats en compétition (compétitions trop rares, et niveau de l'adversaire difficile à évaluer). Cette étude est la première à notre connaissance à proposer une quantification simple des charges de travail et des performances pour des activités comportant des habiletés ouvertes contre adversaire.

Dans le but d'approfondir nos connaissances dans les adaptations physiologiques sous-jacentes aux variations de performance, nous avons vérifié la pertinence de l'application de la théorie des systèmes chez des rongeurs entraînés en résistance selon un modèle d'escalade avec charges additionnelles de masse progressivement croissante. Dans cette étude 2, nous avons montré que le modèle classique des effets de l'entraînement formulé par Banister s'applique de manière significative. Ce résultat ouvre de large perspective en particulier la détermination biologique des composants du système de réponse à l'entraînement. C'est le point de départ de l'étude 4 en cours.

L'objectif cette étude 4 a été de proposer une nouvelle formulation de modèle s'approchant plus de la réalité physiologique des adaptations à l'entraînement en résistance. Cette étude représente une première tentative de formulation d'un modèle dont la structure est établie elle-même à partir de mesures biologiques. Ainsi, la structure mathématique du modèle physiologique s'écarterait nettement de celle des modèles précédents.

Le recueil des mesures biologiques nécessaires à l'élaboration de ce modèle physiologique nécessite la compréhension du fonctionnement musculaire et de ses adaptations à l'entraînement susceptibles de supporter des gains de performance observés chez nos animaux entraînés. Le fonctionnement général du muscle et sa plasticité à l'exercice font l'objet du chapitre suivant.

- CHAPITRE 2 -

DE LA CONTRACTION À LA PLASTICITÉ
MUSCULAIRE

1. Contraction musculaire et ATP : Un cycle en mouvement

La contraction musculaire fascine les scientifiques et les profanes depuis des siècles. Cependant, son étude approfondie n'a été rendue possible qu'avec le perfectionnement des techniques de microscopie qui ont permis d'observer le muscle jusque dans sa structure intime. C'est à la fin du 19^{ème} siècle que l'aspect strié du muscle squelettique a pu être révélé. Au début du 20^{ème} siècle, on réduisait encore le muscle à un corps élastique qui se raccourcissait lors de sa stimulation grâce à une quantité constante d'énergie permettant les échanges élastiques (Grasser & Hill, 1924). Cette théorie a été rapidement réfutée par les travaux de Wallace Fenn qui a montré que le muscle produit une quantité d'énergie proportionnelle à l'énergie thermique produite et au travail mécanique (Fenn, 1923, 1924). Cette relation est différente selon les modalités de régime de contraction et est aujourd'hui connue sous le nom d'effet Fenn. Huxley a formalisé une nouvelle théorie de la contraction musculaire dès 1953 (Hanson & Huxley, 1953). Les bases de sa théorie sont toujours valables actuellement. Ses travaux ont montré que les myofilaments de l'unité contractile ne se raccourcissent pas mais que la contraction résulte du glissement relatif des filaments fins d'actine le long des filaments épais de myosine. Il propose un premier modèle à deux étapes en 1957 (**figure 9A**) et un nouveau, plus abouti, en 1963 (Huxley, 1957, 1963). Dans ce nouveau modèle, l'interaction actine-myosine est opérée grâce à une rotation des têtes de myosine, qui détermine in fine le glissement des filaments fins par rapport aux filaments épais (**figure 9B**). Une molécule d'ATP est hydrolysée pour chaque cycle mécanique effectué. Aujourd'hui, le modèle initial à 2 étapes a subi de nombreuses extensions même si les bases demeurent inchangées.

Par ailleurs, il me semble important de définir le terme de contraction. Par abus de langage, on parle de contraction lorsque le muscle se raccourcit, mais c'est en fait un cas particulier. L'action musculaire peut être isométrique c'est à dire sans changement de longueur du muscle entre ses extrémités, ou anisométrique. Dans ce dernier cas de figure, le muscle se raccourcit ou résiste à l'allongement. On parle alors d'action concentrique ou excentrique, respectivement. Il est important de noter que lors des « contractions » concentriques et excentriques, les niveaux maxima de force sont fondamentalement différents.

Les connaissances actuelles relatives à l'interaction actine-myosine au cours de la contraction font l'objet du chapitre suivant. Dans un premier temps, l'organisation structurale et fonctionnelle du muscle squelettique est abordée. Puis, dans un second temps, la cinétique du cycle nécessitant la fixation, l'hydrolyse de l'ATP et la libération des produits de cette hydrolyse, est détaillée.

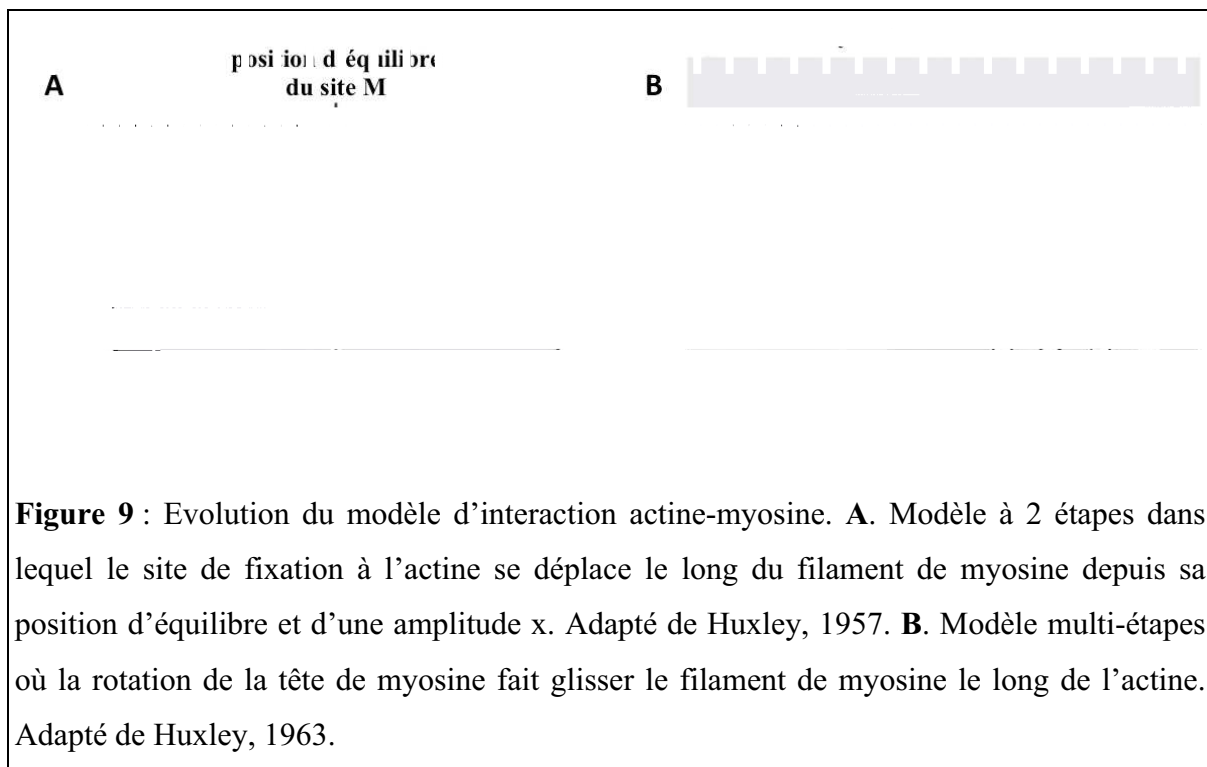


Figure 9 : Evolution du modèle d'interaction actine-myosine. **A.** Modèle à 2 étapes dans lequel le site de fixation à l'actine se déplace le long du filament de myosine depuis sa position d'équilibre et d'une amplitude x . Adapté de Huxley, 1957. **B.** Modèle multi-étapes où la rotation de la tête de myosine fait glisser le filament de myosine le long de l'actine. Adapté de Huxley, 1963.

1.1. La relation structure - fonction du muscle squelettique

Le tissu musculaire est constitué de fibres dont il en existe deux types bien distincts. D'une part la fibre musculaire lisse, qui forme la paroi des viscères et des vaisseaux sanguins, et d'autre part la fibre musculaire striée, qui forme l'élément constitutif du tissu squelettique et cardiaque. Nous nous intéresserons ici uniquement au muscle strié squelettique. Sa structure hautement organisée peut être observée de l'échelle macroscopique du tissu entier, jusqu'à l'échelle microscopique et moléculaire des protéines du sarcomère, unité fonctionnelle de la myofibrille (**figure 10**).

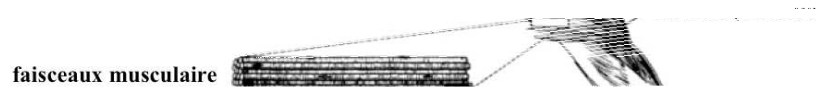


Figure 10 : Représentation schématique de l'organisation structurelle du muscle strié squelettique. Les représentations des têtes de myosines et du filament d'actine ont été obtenues par cristallographie. Adapté de Koubassova et Tsaturyan, 2011.

1.1.1. La fibre et ses myofibrilles

La fibre musculaire est une cellule cylindrique géante dont la longueur peut varier de quelques millimètres à plusieurs centimètres pour un diamètre de 50 à 100 μm chez l'Humain (Koubassova & Tsaturyan, 2011). Elle est entourée d'une membrane plasmique, le sarcolemme, constituée d'une bicouche lipidique d'une épaisseur de 3 nm. Sous le sarcolemme, sur toute la périphérie de la cellule, se trouvent les noyaux extrêmement nombreux qui contiennent toute l'information génétique sous forme d'ADN. Tout l'espace intracellulaire restant est occupé par les myofibrilles, qui peuvent atteindre le nombre 1000 par cellule.

La myofibrille est un organite subcellulaire dont le diamètre est de 1 à 2 μm et qui court longitudinalement d'une extrémité à l'autre de la fibre musculaire. Du fait qu'une fibre

musculaire peut en contenir de 100 à 1000, la force générée par une seule myofibrille est inférieure à 1 μN , c'est à dire 100 à 1000 fois inférieure à la force générée par une fibre (Stehle *et al.*, 2009). Alors que cette connexion des fibres en parallèle permet d'augmenter la force de contraction, leur structure sérielle leur confère une grande amplitude de raccourcissement. Ce raccourcissement, qui s'effectue au niveau myofibrillaire, est rendu possible grâce à la structure même des myofibrilles. En effet, une myofibrille est constituée par une succession de courtes unités cylindriques, appelées sarcomères, connectées en série conférant la nature striée caractéristique qui repose sur une alternance de bandes sombres et claires observables au microscope optique

1.1.2. Le sarcomère et ses protéines

1.1.2.1. Une structure hautement organisée

Le sarcomère définit l'unité de contraction, il possède la structure la plus hautement ordonnée de tous les organites cellulaires. Il est délimité par 2 disques Z voisins d'une épaisseur de 0,07 μm et sont composés principalement de filaments fins et épais entrecroisés et organisés en parallèle. Les filaments fins ont un diamètre compris entre 65 et 90 Å pour une longueur comprise entre 0,5 et 1 μm (Huxley, 1963; von der Ecken *et al.*, 2015). Ils sont constitués principalement d'actine, avec également des protéines de régulation. Ils sont à l'origine de la bande claire, isotrope (I) en lumière polarisée, qui ne contient que des filaments d'actine, et qui ne chevauche pas avec les filaments de myosine. Les filaments épais ont un diamètre d'environ 165 Å pour une longueur de 1,5 à 1,6 μm (Huxley, 1963). Ils sont composés essentiellement de myosine (Hanson & Huxley, 1953) et sont ancrés sur la ligne M. Ces filaments apparaissent sombres en lumière polarisée, c'est la bande anisotrope (A) située au centre du sarcomère. Le sarcomère présente ainsi une symétrie à 180° selon l'axe de la ligne M. Ses deux moitiés semblent être l'image d'une de l'autre dans un miroir en microscopie électronique mais ce n'est pas tout à fait vrai au niveau moléculaire car le sens des hélices est toujours le même dans les deux moitiés (Candau & Kawai, 2010). Toutes ces mesures confèrent au sarcomère longueur de 1,8 μm en contraction maximale (lorsque les filaments épais et fins se chevauchent à 100%) jusqu'à 4 μm lors de l'étirement maximal supra physiologique (sans aucun chevauchement des filaments fins et épais) (Higuchi, Yanagida, & Goldman, 1995).

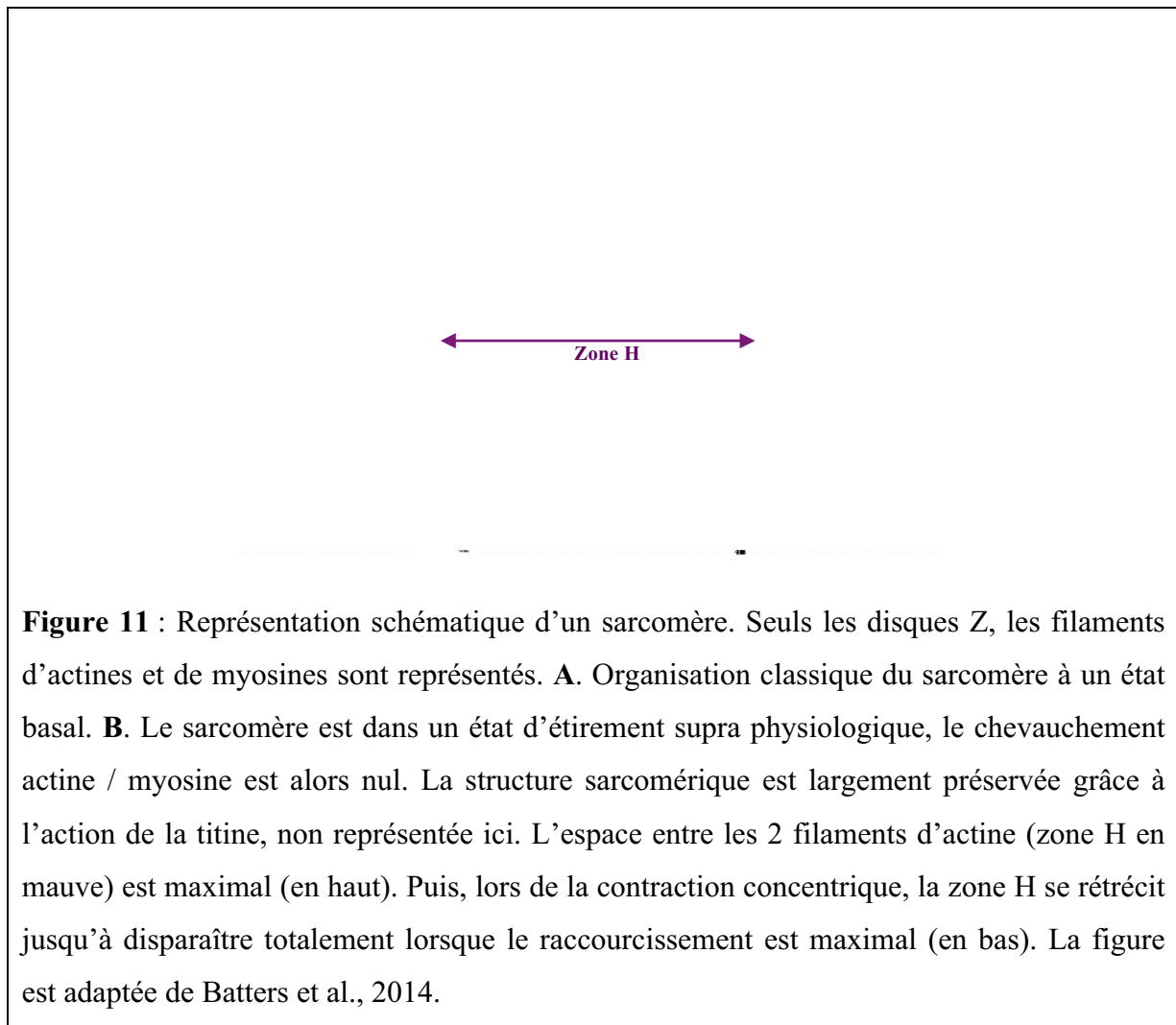
Ces observations effectuées au microscope électronique ont permis de comprendre la

structure sarcomérique mais également les bases des mécanismes de la contraction. Lors de la contraction concentrique, la bande sombre A reste constante (la longueur des filaments épais de varie pas) alors que la bande claire I se raccourcit (Hanson & Huxley, 1953). La zone H, qui détermine la distance entre deux filaments fins, se raccourcit au cours de la contraction concentrique jusqu'à disparaître totalement lorsque le chevauchement actine/myosine est maximal (**figure 11**). Par ailleurs, il est important de noter que le sarcomère n'est pas une structure plane, contrairement à ce que pourrait laisser penser les représentations schématiques classiques. En coupe transversale, on peut apprécier sa structure tridimensionnelle, dans laquelle chaque filament de myosine est voisin de 6 filaments d'actine.

Le sarcomère est également riche en titine (ou connectine), protéine géante d'un poids moléculaire compris entre 3 et 4 kDa (Labeit & Kolmerer, 1995) qui constitue le troisième système de myofilaments. La titine s'étend sur la moitié d'un sarcomère couvrant la distance allant de 1 à 2 μm qui sépare la ligne M du disque Z. Son rôle est déterminant dans la génération de la tension passive observée lors de l'étirement, situation au cours de laquelle le chevauchement est perdu entre l'actine et la myosine (Horowitz *et al.*, 1986). De nombreuses études récentes montrent que la titine joue un rôle fondamental dans la production de force lors de la contraction excentrique (Leonard & Herzog, 2010). En effet, la titine serait responsable de l'augmentation de la tension passive générée lors de l'étirement actif à travers deux mécanismes distincts et complémentaires. La tension passive serait attribuée à hauteur de 15% à l'effet direct de la fixation du Ca^{2+} sur des domaines riches en acide glutamique des segments PEVK (riche en Proline, Acide glutamique, Valine et Lysine) et Ig (immunoglobuline) de la titine induisant une augmentation de sa raideur intrinsèques et à hauteur de 85% à sa fixation sur les filaments fins (Powers *et al.*, 2014). Un modèle à 3 filaments (actine, myosine et titine) est proposé par ces auteurs pour compléter celui classique du cycle mécano-chimique et a fait l'objet d'une revue de la littérature publiée très récemment (Herzog *et al.*, 2015).

Ainsi lors de la contraction, les sarcomères changent de longueur mais pas les filaments fins et épais, ou du moins très faiblement en raison de leur compliance réduite. La contraction est rendue possible grâce à une interaction cyclique entre actine et myosine par l'intermédiaire de ponts du même nom aussi dénommés "cross-bridges" dans la littérature scientifique anglo-saxonne. L'hydrolyse de molécules d'ATP, dont le site de fixation se situe dans la partie motrice de la myosine (domaine catalytique) est indispensable pour fournir l'énergie

nécessaire à la production de force et au raccourcissement (Szent-Gyorgyi, 1953).



1.1.2.2. L'actine au cœur des filaments fins

L'actine

Découverte par Straub en 1942, l'actine était jusqu'alors confondue avec la myosine (Perry, 2003). Straub la nomma "actine" pour sa fonction d'activation de la myosine. L'actine est la protéine la plus abondante du cytosquelette des cellules eucaryotes. Sa forme globulaire (actine-G) a une masse de 42 kDa et est constituée d'une chaîne de 375 acides aminés (Kabsch & Vandekerckhove, 1992). C'est une protéine très conservée au cours du processus d'évolution si bien qu'entre l'Humain et l'Amibe, seulement 10% de sa séquence d'acides aminés diffèrent (Sheterline & Sparrow, 1994). Sa variabilité qui s'exprime dans la présence de différentes isoformes est donc plus dépendante du type de cellule que de l'espèce. L'actine-G polymérise spontanément dans des concentrations salines physiologiques. Afin

d'observer sa structure, elle doit être complexée à d'autres protéines comme la gelsoline, la profiline ou la DNase 1 qui empêchent sa polymérisation en actine filamentaire (actine-F). Une analyse par diffraction aux rayons X du complexe actine-DNase 1 a révélé un monomère de 55 x 55 x 35 Å structuré en 2 domaines divisés chacun en 2 sous-domaines si bien que le monomère contient 4 sous-domaines (1, 2 et 3, 4 ; **figure 12**) (Kabsch *et al.*, 1990). La poche de fixation pour les nucléotides (ATP ou ADP) se trouve au centre de ces 4 sous-domaines. La protéine contient également 4 sites de fixations pour l'ion divalent Ca^{2+} .

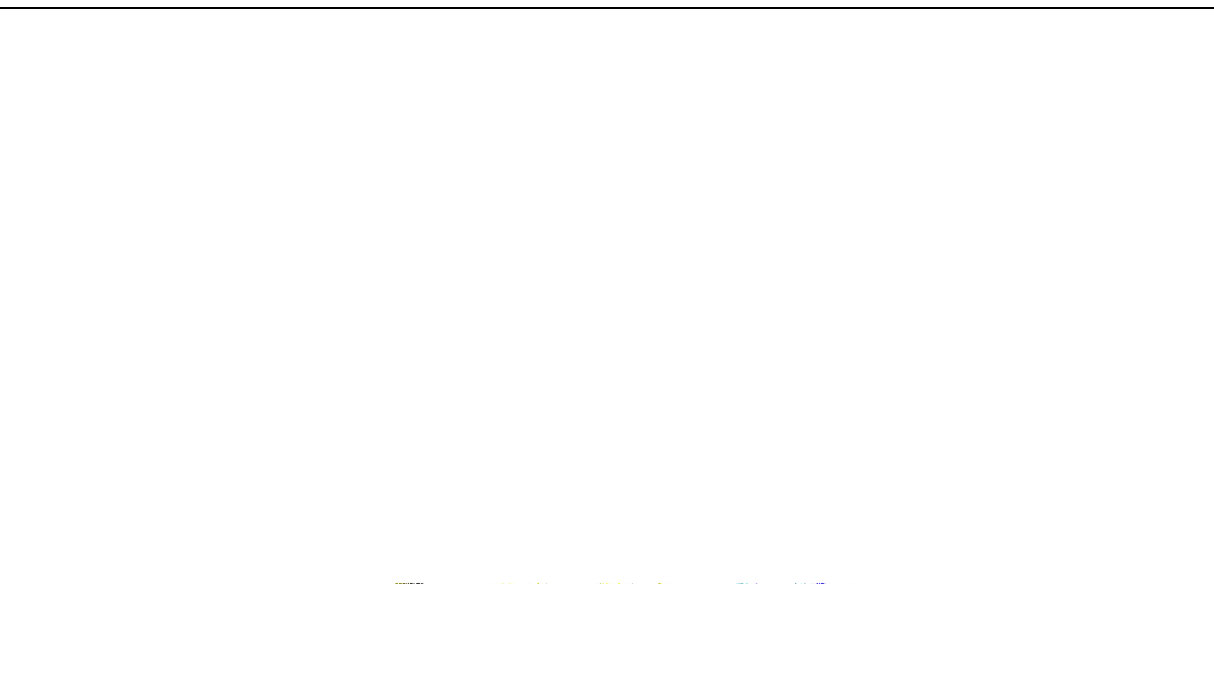


Figure 12 : Représentation en ruban de l'actine-G. La structure cristalline a été obtenue par blocage de sa polymérisation en actine filamentaire par liaison covalente de la sonde fluorescente tetramethylrhodamine-5-maleimide (TMF) sur la cystéine³⁷⁴. Les 4 sous-domaines sont représentés par les différentes couleurs. Le domaine de fixation de la DNase 1 se trouve sur le sous-domaine 2 (en vert). La poche de fixation de nucléotide (ici ADP) est visible au centre du monomère. Les 4 sphères rouges représentent les ions Ca^{2+} fixés sur le monomère d'actine. La figure est tirée de Otterbein, Graceffa, & Dominguez, 2001.

A haute force ionique (en présence de KCl, NaCl, MgCl_2), l'actine-G polymérise spontanément pour former l'actine filamentaire (actine-F). Ces filaments sont polarisés. Ils possèdent des extrémités “plus” et “moins” qui sont établis selon le sens de polymérisation du filament. Les monomères d'actine liés à l'ATP viennent se fixer à

l'extrémité plus. Une fois liée, le monomère hydrolyse plus facilement l'ATP. L'extrémité "moins" est donc composée de monomères liés à l'ADP et au Pi. La libération de ce dernier permet la dissociation du monomère du reste du filament (Murakami *et al.*, 2010). Les extrémités "plus" et "moins" déterminent ainsi le sens de polymérisation du filament d'actine mais également le sens de déplacement de la myosine en leur long. Les filaments sont impliqués dans de nombreux processus de motilité et peuvent représenter jusqu'à 15% des protéines totales au sein du muscle squelettique. La détermination de la structure filamentaire est difficile à cause de sa flexibilité et de sa résistance à la cristallisation. Des modèles structuraux de l'actine-F ont pu être obtenus par cryomicroscopie électronique (Holmes *et al.*, 1990; Sousa, Stagg, & Stroupe, 2013) ou par interprétation de données obtenues par diffraction aux rayons X (Oda *et al.*, 2009). Ces filaments peuvent être vus soit comme une simple hélice gauche d'un angle de rotation de 166° par monomère dont le pas est formé par 13 monomères et mesure 37 nm de long, soit par une double hélice droite, dont le pas est moitié moins long (Holmes *et al.*, 1990).

Les filaments fins aux rayons X

Structure de base et constituant principal des filaments fins du sarcomère, l'actine-F est en interaction avec deux autres protéines majeures, que sont la troponine (Tn) et la tropomyosine (TM). Leur régulation par le calcium leur confère un rôle à la fois dans la contraction, mais également lors de la relaxation (Filatov *et al.*, 1999; Levitsky *et al.*, 2000). La TM a été découverte et isolée pour la première fois en 1947 par Bailey (Bailey & Perry, 1947). Sa nature asymétrique a été détectée quasiment immédiatement en raison de sa facilité de cristallisation. Elle présente une structure filamentaire de double hélice, elle-même enroulée le long de l'actine-F selon une symétrie hélicoïdale (**figure 13**). Elle est composée de la pseudo-répétition de 7 sous-unités et possède un poids moléculaire de 65 kDa (Koubassova & Tsaturyan, 2011; von der Ecken *et al.*, 2015). La fixation de la TM et l'actine-F est régulée par les interactions intrinsèques entre la TM et les monomères d'actine, par le chevauchement en tête-à-queue des monomères de TM le long de l'actine-F et par d'autres protéines présentes comme la myosine et la troponine qui favorisent l'interaction TM-actine. Cette interaction, électrostatique par nature, a été mise en évidence par des images aux rayons-X (Lorenz *et al.*, 1995).

La Tn est une protéine présente exclusivement dans le muscle strié. Cette protéine globulaire a été découverte dans les années 1960 par Ebashi et collaborateurs (Ebashi, 1963; Ebashi &

Ebashi, 1964; Ebashi & Kodama, 1965). Localisée le long du filament d'actine, sa fonction est régulatrice dans la contraction. Elle est composée de 3 sous-unités possédant chacune des propriétés distinctes. La troponine C (TnC) fixe les ions Ca^{2+} . Le retrait sélectif de la TnC sur fibre musculaire inhibe la production de force et l'activation de la contraction car le signal calcique est alors inopérant (Moss, Diffie, & Greaser, 1995). La TnC est donc directement impliquée dans le couplage excitation-contraction et est activée lors du signal calcique au cours duquel la concentration intracellulaire en Ca^{2+} passe de 10^{-7} à 10^{-5} M. Ces concentrations physiologiques demeurent très largement inférieures à celle qui détermine une activité maximale de la myosine ATPase utilisée pour les études en conditions *in vitro* (Canepari *et al.*, 2005). La troponine I (TnI) est inhibitrice. Cette sous-unité est liée à l'actine et autres sous-unités de Tn et bloque la fixation de l'actine sur la myosine. Lors de l'influx calcique, la TnC fixe le calcium et provoque la libération des sites de fixation de l'actine sur la myosine par la TnI. L'inhibition est levée et l'entrée dans le cycle mécano-chimique est possible. La troisième sous unité de la Tn est la troponine T (TnT). Cette sous-unité a un rôle de "colle" structurelle qui maintient lié le complexe Tn-TM-actine. Plus précisément, elle intervient dans la liaison du complexe TnC-TnI au complexe TM-actine ainsi que dans la liaison de l'actine à la TM. Les mécanismes d'action de ces protéines de régulations sont détaillés dans l'étude de Gordon et collaborateurs et dans les références citées (Gordon, Homsher, & Regnier, 2000).



Figure 13 : Structure du complexe actine / tropomyosine obtenu par cryomicroscopie électronique. A gauche, les monomères d’actine-G sont représentés en vert, cyan et gris, et la tropomyosine en jaune. Les structures hélicoïdales de ces 2 protéines sont bien visibles. A droite, vue resserrée du complexe actine / tropomyosine. On voit en rouge, au centre d’un monomère, le site de fixation de l’ADP. La figure est tirée de von der Ecken et collaborateur, 2015 (von der Ecken *et al.*, 2015).

1.1.2.3. La myosine et ses filaments épais

Par comparaison avec l’actine, la myosine est une protéine motrice qui présente de nombreuses isoformes. Dans la cellule eucaryote, sa superfamille comporte plus de 35 classes (établies sur les différences entre les domaines moteurs) dont 13 sont présentes chez l’Humain (Odrionitz & Kollmar, 2007). Elle est impliquée dans divers processus comme le mouvement cellulaire, le trafic membranaire (endo- exocytose, transport et adressage intracellulaire), la transduction du signal, l’organisation de l’appareil de Golgi et bien sûr la contraction musculaire. Dans tous ces processus à l’origine du mouvement, la myosine interagit avec l’actine-F, le long de laquelle elle se déplace et cela grâce à une activité ATPasique, présente au niveau de son domaine catalytique. Les myosines possèdent une ou

deux tête et à l'exception de la classe des myosines VI qui se déplace vers l'extrémité "moins" du filament d'actine (Wells *et al.*, 1999), toutes se déplacent vers son extrémité "plus". Toutes les classes de myosines possèdent une ou deux chaîne(s) lourde(s) composée(s) de deux parties : La partie motrice et la queue dont la structure spatiale est conservée que ce soit entre les espèces (amibes, vertébrés, drosophile) ou selon le type cellulaire (cellule musculaire, neurone).

Nous nous intéresserons ici à la myosine II, composant essentiel du muscle strié.

La myosine

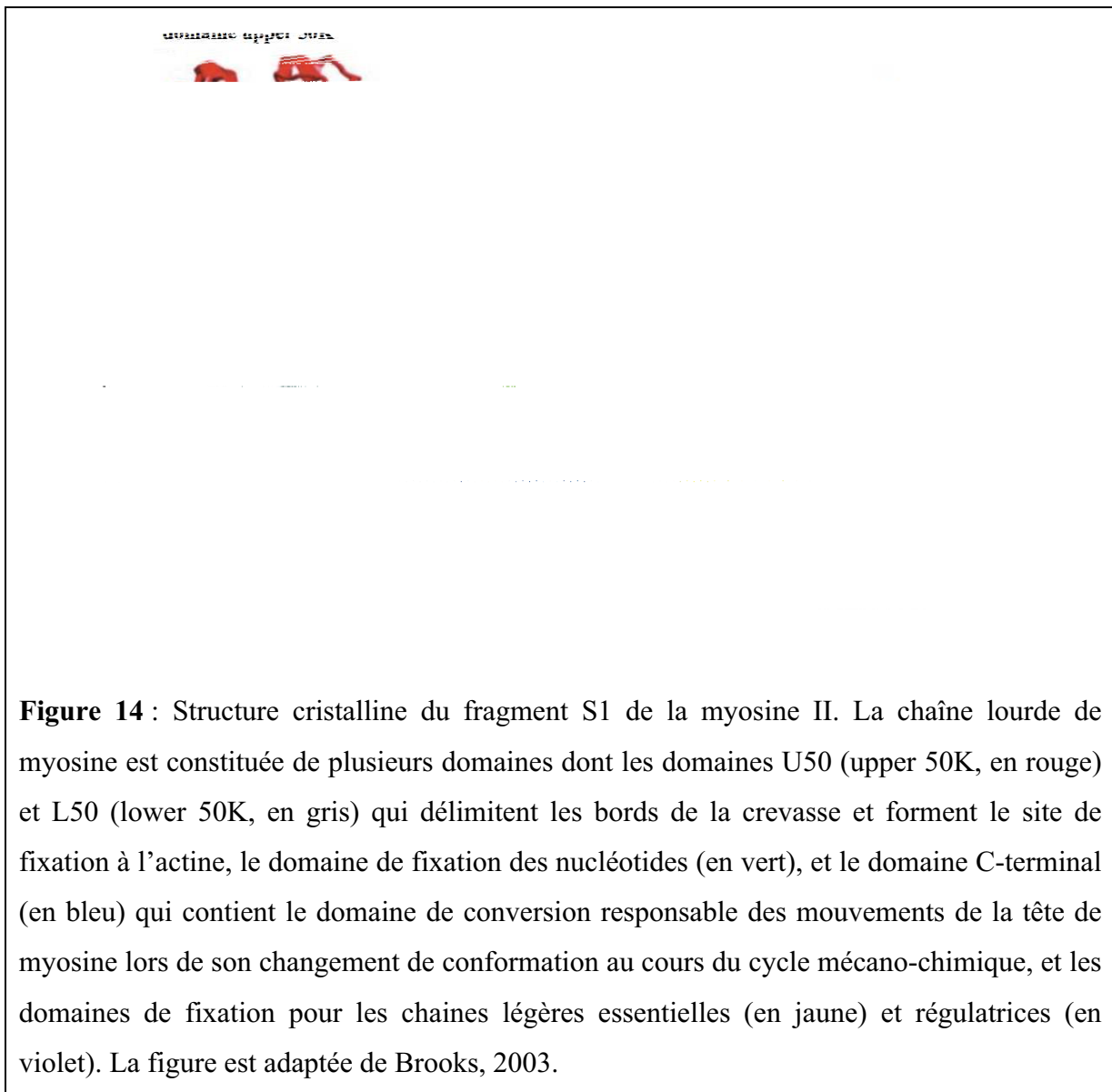
Au sein du muscle strié squelettique, la myosine est un hexamère constitué de 2 sous-ensembles de 3 chaînes polypeptidiques chacun. Le trimère est composé d'une chaîne lourde (MHC) (**figure 14**) de 230 kDa, et de 2 chaînes légères (MLC), une essentielle (ELC) et une régulatrice (RLC). Ces deux sous-ensembles sont enroulés entre eux par leur queue si bien que l'ensemble formé possède 2 MHC et 4 MLC pour un poids moléculaire total d'environ 520 kDa. Les parties C-terminales des deux MHC d'environ 1100 acides aminés chacune s'enroulent pour former une double hélice entrelacée (queue ou "coiled-coil"). Les interactions intermoléculaires entre les queues de différentes molécules de myosines sont à l'origine de la formation des filaments bipolaires. Les interactions parallèles et antiparallèles entre deux queues voisines sont liées à deux courtes régions présentes à la partie C-terminale et qui affichent un profil électrostatique unique composé de courts segments alternés de charges positives et négatives (Sohn *et al.*, 1997; Rosenberg *et al.*, 2008).

La digestion de la myosine à la chymotrypsine (protéase qui clive la chaîne polypeptidique après les résidus tyrosine, tryptophane, phénylalanine ou leucine) en présence d'EDTA permet d'isoler le fragment S1 de la queue, elle-même composée d'un fragment N-terminal S2 et de la méromyosine légère.

Le fragment S1

Le fragment S1, partie motrice de la myosine, a été cristallisé pour la première fois par Rayment et collaborateurs en 1993 à une résolution de 3 Å (Rayment *et al.*, 1993a,b). Il contient le domaine catalytique (la tête), le domaine de conversion, et le cou ("lever arm" en anglais pour "bras de levier"), responsable du mouvement (Uyeda, Abramson, & Spudich, 1996). La tête contient la poche de fixation des nucléotides (ATP et ADP) qui consiste en un motif P-loop conditionné par les domaines switch 1 et switch 2 et possédant la capacité d'hydrolyse de l'ATP. Sur la tête, se trouve également le site de fixation à

l'actine formé par une crevasse délimitée par deux domaines, nommés upper 50K (U50) et lower 50K (L50) (**figure 14**).



Le lever arm

Le lever arm est une longue région de la chaîne lourde structurée en hélice α qui présente deux domaines distincts. Un domaine de conversion responsable des mouvements de la tête et un domaine plus long pour la fixation des MLC appartenant à la superfamille des calmodulines. Cette région contient 2 motifs IQ (riche en Isoleucine et en Glutamine) stabilisés par le recrutement des chaînes MLC. IQ1 fixe ainsi les chaînes légères essentielles (ELC1 et 2) et IQ2 fixe les chaînes légères régulatrices (RLC) (Pylypenko & Houdusse,

2011). Ces chaînes ne sont pas indispensables pour la liaison avec l'actine ni même pour l'hydrolyse de l'ATP mais possèdent néanmoins un rôle majeur dans la régulation des interactions actine-myosine. En effet, les RLC possèdent un site de fixation au calcium (Morimoto & Harrington, 1974) et peuvent être phosphorylées par la kinase des MLC (MLCK) venant ainsi réguler la force générée par la fibre musculaire (se référer à Vandenoorn et al., 2013 pour une revue complète sur MLC (Stull, Kamm, & Vandenoorn, 2011). Le lever arm existe sous deux conformations différentes, l'état pre-recovery (ou post-rigor) et l'état post-recovery (ou pre-powerstroke) (Sweeney & Houdusse, 2010) dont la transition de l'un à l'autre est appelée recovery stroke. L'étape critique du recovery stroke réside dans la rotation du domaine de conversion qui passe d'une position "up" à l'état de pre-recovery, à une position "down" à l'état post-recovery (**figure 15**).

La contraction musculaire repose sur l'interaction cyclique entre les filaments fins et la tête de myosine, mettant en jeu des changements de conformation et l'hydrolyse de l'ATP. Mais comment l'interaction actine-myosine est-elle régulée ? Et quels sont les modèles actuels du cycle mécano-chimique ? Quels rôles pour les domaines moteurs et inter-moteurs ? Des éléments de réponses seront établis dans la partie suivante.

Myosin rigor F-actin Dissociation Myosin.ATP
Post-rigor

Figure 15 : Etats structuraux connus de la myosine dans le cycle mécano-chimique. L'arrivée de l'ATP provoque le détachement de l'actine. On passe alors d'un état pre-recovery (ou myosin.ATP post-rigor) à un état post-recovery (ou pre-powerstroke) dont la transition se fait pendant le recovery stroke grâce à l'hydrolyse de l'ATP. S'en suit la fixation sur l'actine puis le powerstroke conditionné par la libération du Pi puis de l'ADP où l'on passe de l'état pre-powerstroke à l'état myosin rigor. Sur le schéma, ELC et RLC sont les chaînes légères essentielles et régulatrice, respectivement (en cyan). A la base du lever arm représenté par l'hélice alpha (en bleu), on distingue le domaine de conversion (en vert) qui se prolonge par le domaine moteur (en mauve). En plus du fragment S1, trois monomères d'actine-G sont représentés. Deux sont représentés par des sphères (en jaune). Pour le 3^{ème} monomère, les 4 sous-domaines sont détaillés (sous-domaine 1 en rose, sous-domaine 2 en vert clair, sous-domaine 3 en bleu clair et sous-domaine 4 en violet). La figure est tirée de Sweeney & Houdusse, 2010.

1.1.3. Cycle mécano-chimique : Une histoire qui ne tourne pas rond

Depuis sa découverte dans les années 50 jusqu'à aujourd'hui, la compréhension du cycle mécano-chimique, reposant principalement sur l'interaction actine-myosine, n'a cessé de progresser. Le domaine moteur de la myosine, capable de fixer l'actine et l'ATP et d'hydrolyser ce dernier a fait l'objet de recherches extensives. Plus récemment, de nombreuses études ont été orientées sur le rôle des domaines inter-moteurs de la myosine qui semblent également avoir une importance capitale dans la régulation de l'interaction actine-myosine et dans la cinétique du cycle mécano-chimique.

Dans un premier temps, l'interaction actine-myosine sera étudiée à l'échelle des moteurs moléculaires et nous verrons comment les changements de conformation tridimensionnelle de ces deux protéines permettent leur interaction et une production de mouvement. Dans un second temps, cette interaction sera placée dans le contexte cyclique de la contraction musculaire et sera observée à l'échelle de la myofibrille. La chorégraphie du cycle mécano-chimique, déterminé par les changements d'affinités pour les différents partenaires (actine, myosine et nucléotides), sera étudiée dans son ensemble.

1.1.3.1. L'interface actine-myosine, des moteurs en action

Grâce à une évolution récente des méthodes de diffraction aux rayons-X de la myosine (Rayment *et al.*, 1993b; Geeves & Holmes, 1999; Houdusse & Sweeney, 2001) et de la microscopie électronique du complexe actine-myosine (Volkman *et al.*, 2000; Holmes *et al.*, 2003; Lorenz & Holmes, 2010), nous nous sommes rendu compte de l'importance des structures tridimensionnelles de l'actine et de la myosine et des effets de leurs modifications conformationnelles, même discrètes, sur l'interaction actine-myosine. Cependant, plusieurs méthodes d'exploration sont susceptibles de modifier le comportement natif des protéines. Une étude comparative entre les méthodes d'analyse de la contraction en motilité *in vitro* (IVMA) et sur fibre musculaire a révélé que ces méthodes expérimentales altéraient la nature même de l'interaction actine-myosine (Sugi *et al.*, 2014). Ces auteurs ont déterminé le rôle des différents domaines du fragment S1 dans les deux conditions expérimentales par blocage de ces domaines par des anticorps spécifiques. Ils ont montré un effet inhibiteur de l'anticorps fixé au domaine de conversion sur le glissement actine-myosine en IVMA mais pas sur fibre. De la même manière, le blocage de deux peptides de la chaîne régulatrice a induit une diminution de la force développée par les fibres mais pas en IVMA (Sugi *et al.*,

2014). Une explication serait que dans les conditions IVMA, l'orientation des têtes de myosines est désorganisée comparé à leur orientation régulière au sein du sarcomère.

Une interaction régulée par les chaînes légères

Les MLC sont connues pour moduler la conformation des myosines musculaires. Une phosphorylation des RLC par la MLC kinase dépendante du calcium (MLCK) provoque une désorganisation des filaments de myosine, réversible par l'ajout de la sous-unité catalytique d'une phosphatase (Levine *et al.*, 1996, 1998). L'action combinée de la MLCK et de la phosphatase permet de maintenir un état de phosphorylation des RLC relativement constant. Lorsque le muscle subit des sollicitations importantes et atteint un état de fatigue, le niveau de phosphorylation des RCL augmente (Cooke, 2007; Greenberg *et al.*, 2010). L'idée générale est que la phosphorylation des RLC stabilise le lever arm dans une position favorable à l'interaction actine-myosine. Au sein des cardiomyocytes, la phosphorylation des RLC détermine une augmentation des charges négatives répulsives responsable d'un éloignement des têtes de myosines du filament épais lui-même, les rapprochant des filaments d'actine (Sweeney *et al.*, 1994), régulant ainsi la contractilité cardiaque (Kampourakis & Irving, 2015). Au sein du muscle strié squelettique, un tel état de phosphorylation induit une augmentation de la vitesse de redéveloppement de la force à faibles concentrations calciques seulement (Metzger, Greaser, & Moss, 1989). Cependant, une étude récente réalisée sur myofibrille montre que la phosphorylation des RLC n'aurait pas d'effet sur la cinétique du cycle mécano-chimique, que ce soit au niveau du détachement des ponts actine-myosine, de la fixation de la myosine sur l'actine, ou du powerstroke (Duggal *et al.*, 2014). Les RLC présenteraient donc des effets distincts selon les différents types de tissus musculaires.

Au sein des muscles striés, deux isoformes d'ELC, A1 et A2 (également nommées LC1 et LC3, respectivement) ont été caractérisées. Ces isoformes diffèrent par la présence d'une chaîne supplémentaire de 41 acides aminés à l'extrémité N-terminale de A1 (Frank & Weeds, 1974). La myosine contenant l'isoforme A2 (S1A2) est exprimée au sein des fibres lentes et rapides alors que la myosine contenant l'isoforme A1 (S1A1) est uniquement exprimée dans les fibres lentes (squelettiques et cardiaques) (Lowey & Risby, 1971; Weeds & Taylor, 1975; Wagner & Weeds, 1977). S1A1 présente une plus forte affinité pour l'actine comparé à S1A2 suggérant que les contacts intermoléculaires entre A1 et l'actine déterminent la force de l'interaction actine-myosine (Lowey, Waller, & Trybus, 1993). Les ELC régulent donc la transition d'un état de liaison faible du complexe actine-myosine vers

un état de liaison forte, et ce, d'une manière dépendante de l'isoforme de chaîne légère (Prochniewicz, Guhathakurta, & Thomas, 2013). Les vitesses maximales de raccourcissement à charge nulle (V_0) des fibres musculaires chez le lapin et le rat augmentent proportionnellement avec le contenu en A1 (Greaser, Moss, & Reiser, 1988; Bottinelli *et al.*, 1994a; Sweeney, 1995). Ces résultats obtenus sur fibres musculaires suggèrent que les isoformes d'ELC sont impliquées dans la régulation de V_0 au sein du muscle. D'un point de vue structurel, l'extrémité N-terminale de A1 permet à S1A1 de former un complexe acto-myosine différent de celui formé par S1A2 dans les deux états de pré- et post-powerstroke. Lors de la transition d'un état à l'autre, l'amplitude du powerstroke est plus petite pour le S1A2 que pour le S1A1 conférant aux fibres musculaires des propriétés contractiles différentes (Guhathakurta, Prochniewicz, & Thomas, 2015).

Le lever arm dans tous ses états

L'interaction actine-myosine est également régulée par le lever arm. Au sein des myosines V et VI impliquées dans divers processus cellulaires (transport membranaire ou mise en réseaux d'organites), les mouvements collectifs des têtes de myosines sont dépendants du lever arm (Hariadi, Cale, & Sivaramakrishnan, 2014). Une modification de sa flexibilité modifierait les trajectoires collectives des têtes de myosines, soulignant l'importance des domaines inter-moteurs sur les propriétés contractiles de ces myosines (Hariadi *et al.*, 2014). En ce qui concerne les myosines II musculaires, des mutations à la base du lever arm sur les Lys⁸⁴ et Arg⁷⁰⁴ perturbent les cinétiques d'hydrolyse de l'ATP et de libération de phosphate, sans affecter la fixation de l'ATP (Málnási-Csizmadia *et al.*, 2007). Ainsi, le recovery stroke qui précède l'hydrolyse de l'ATP semble moduler finement les vitesses d'hydrolyse de l'ATP et de libération du Pi. Par ailleurs, les observations réalisées par diffraction aux rayons-X et par microscopie électronique ne convergent pas et suggèrent des mécanismes différents dans le déplacement du fragment S1. Selon la première hypothèse, plus largement répandue, l'amplitude du déplacement serait portée essentiellement par le changement de conformation du domaine de conversion, à la base du lever arm, lors des recovery- et powerstroke (Geeves & Holmes, 1999; Houdusse & Sweeney, 2001). Ce modèle prévoit une bascule de la tête de myosine, pour un ATP hydrolysé (**figure 16a**). Cependant, des observations par microscopie électronique sur protéine isolée suggèrent un autre mécanisme. L'hypothèse serait que plusieurs mouvements de la tête de myosine seraient possibles pour 1 ATP hydrolysé (Yanagida *et al.*, 2000). Ces mouvements résulteraient de l'effet et de mouvement Browniens orientés, si bien qu'ils se feraient à 90% vers l'extrémité plus du

filament d'actine et seulement 10% sont orientés dans le sens opposé (**figure 16b**). Le couplage mécano-chimique pourrait donc être différent de 1 pour 1. Une étude de Nie et collaborateurs vient corroborer cette théorie et suggère que ces mouvements Browniens orientés (déplacement de 5,5-11 nm) et le mouvement du lever arm (déplacement de 3-5 nm) sont couplés et contribuent au recovery stroke, qui s'effectue après la dissociation de l'actine du complexe myosine-ATP (Nie *et al.*, 2014). Les mouvements de la tête de myosine seraient ainsi possibles par l'effet combiné de la charge, de l'accumulation de Pi (le powerstroke devenant réversible) et de mouvements Browniens.



Figure 16 : Modèles fonctionnels proposés pour les moteurs actine-myosine. **(a)** Modèle du lever arm. Une molécule d'ATP permet un déplacement du fragment S1 grâce au changement de conformation du domaine de conversion, à la base du lever arm. **(b)** Modèle Brownien. Une seule molécule d'ATP permet plusieurs déplacements du fragment S1 grâce à l'effet combiné du lever arm et des mouvements browniens. Le croquis est tiré de Yanagida *et al.*, 2000.

1.1.3.2. Evolution du paradigme : attention au phosphate !

Contexte

Depuis les travaux d'Huxley dans les années 50 jusqu'à aujourd'hui, la compréhension du cycle mécano-chimique n'a cessé de s'affiner. Un des premiers modèles d'interaction cyclique a été proposé par Lymn et Taylor (Lymn & Taylor, 1971). La myosine possède une capacité de fixation et d'hydrolyse de l'ATP au niveau de son domaine P-loop, borné par les motifs switch 1 et switch 2 (Squire & Parry, 2005). Son activité ATPasique est fortement stimulée par la fixation de l'actine, qui joue ici le rôle de facteur d'échange de nucléotide pour la myosine. En absence de nucléotide, l'actine et la myosine sont fortement liés ensemble et forment un complexe à l'état de rigor. Cet état constitue le point de départ du cycle dans la **figure 15**. La fixation de l'ATP sur la myosine détermine la dissociation rapide du complexe actine-myosine et forme ainsi le complexe myosine-ATP. La myosine hydrolyse ensuite l'ATP et forme le complexe stable myosine-ADP-Pi. Puis ce complexe se lie à l'actine, sur le site de fixation le plus accessible. Cela provoque un changement de conformation au niveau du lever arm qui détermine un déplacement de l'actine : le powerstroke. Selon ce modèle original de Lymn et Taylor, le powerstroke est associé à la libération du Pi et l'ADP. Le site catalytique étant libre la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP sur la myosine peut alors intervenir rapidement et le cycle peut recommencer. Dans ce modèle, 3 états structuraux de la myosine ont été caractérisés. Le complexe actine-myosine en rigor, le complexe myosine-ATP (post-rigor ou pre-recovery) et le complexe myosine-ADP-Pi (post recovery ou pre-powerstroke), lié ou non à l'actine (**figure 15**). Depuis, ce modèle a été précisé et le cycle peut être détaillé en 8 étapes fondamentales (Bagshaw & Trentham, 1974). Les étapes de fixation de l'ATP (collision) et de détachement de l'actine sur la myosine (isomérisation) sont décrites par des cinétiques distinctes. De la même manière, les étapes de libération de Pi et d'ADP sont dissociées avec une libération de Pi qui précède celle de l'ADP.

L'équipe de Poggessi a mesuré l'effet de la concentration en Pi sur la force isométrique, sur myofibrilles de muscles lents et rapides de lapin, à 5°C et 15°C (Tesi *et al.*, 2002). Les mesures montrent un effet inhibiteur du Pi sur la force isométrique. Les résultats indiquent que pour les myofibrilles rapides et lentes, la diminution de la force induite par Pi approche une valeur asymptotique proche mais différente de zéro lorsque [Pi] tend vers l'infini. La présence de cette force résiduelle suggère qu'à haute [Pi], il reste une fraction significative

du complexe actine-myosine-ADP-Pi. Ces données soutiennent l'hypothèse que la production de force commence avec une isomérisation du complexe actine-myosine-ADP-Pi qui précède la libération du Pi (Tesi *et al.*, 2002) et sont en accord avec celles obtenues à partir de fragments acto-S1 (Muretta, Petersen, & Thomas, 2013). Cependant, les travaux récents de l'équipe d'Anne Hudousse réalisés également sur fragments acto-S1 suggèrent un mécanisme différent concernant l'origine du powerstroke et la libération de Pi et ADP (Llinas *et al.*, 2015). Leurs résultats, qui tranchent avec la théorie classique, seront détaillés un peu plus loin dans le texte.

Il n'existe pas de consensus concernant les mécanismes responsables de la production de force et de mouvement. En effet, des mesures manquent pour comprendre la chronologie précise des événements chimiques et les changements structuraux du cycle mécano-chimique. Le mécanisme d'action de l'actine sur les changements conformationnels de la myosine à l'origine de la libération de Pi et d'ADP fait ainsi l'objet de nombreuses spéculations (Geeves & Holmes, 2005).

Phosphate et génération de force

Lors de la contraction isométrique, la production de force est proportionnelle au nombre de ponts actine-myosine formés (Brunello *et al.*, 2006) dont la force intrinsèque semble demeurer constante (Linari *et al.*, 2007). Cette fraction de têtes de myosine qui forment les ponts représente 30 à 40% des têtes totales. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration de Pi libre dans le cytosol, liée à l'hydrolyse de l'ATP et à la libération des produits, induit une diminution de la force proportionnelle à la diminution du nombre de ponts actine-myosine (Caremani *et al.*, 2008), indiquant que [Pi] possède un effet sur la distribution des ponts actine-myosine mais pas sur la force intrinsèque des ponts eux-mêmes.

Selon le modèle conventionnel (schéma 1), les productions de force et de mouvement (powerstroke) ne sont rendues possibles qu'après la liaison forte de la myosine sur l'actine (étape 3). Le powerstroke, associé à la libération de Pi commence après la formation d'une liaison forte (Preller & Holmes, 2013). L'ADP peut ensuite être libéré (étape 5). Ce modèle conventionnel du cycle mécano-chimique permet de comprendre les effets du Pi sur la force et le nombre de ponts actine-myosine formés (Linari, Caremani, & Lombardi, 2010).



Schéma 1 : Cycle mécano-chimique conventionnel.

Il est admis qu'une élévation de $[Pi]$ de 10mM réduit l'activité ATPasique de 15% ainsi que la force isométrique par une réduction du nombre de pont actine-myosine de 35-40% (Bowater & Sleep, 1988; Potma, van Graas, & Stienen, 1995; Potma & Stienen, 1996; Linari *et al.*, 2010). Cela représente une augmentation de 40% de l'activité ATPasique par pont et donc du coût énergétique de la contraction. Cet effet du Pi sur l'activité ATPasique ne peut pas être expliqué par le modèle conventionnel. Sur la base de ces informations, Linari et collaborateurs ont proposé un nouveau modèle (Linari *et al.*, 2010). Dans ce modèle ramifié (schéma 2), la production de force se manifeste toujours au cours de l'étape 3. Puis, l'actine aurait aussi la possibilité de se détacher rapidement du complexe myosine-ADP- Pi (étape 6), avant la libération des produits de l'hydrolyse et la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP (étape 7). Deux populations de têtes de myosine cohabiteraient. La population qui poursuivrait un cycle mécano-chimique classique avec libération des produits de l'hydrolyse, fixation de l'ATP et enfin détachement, et la population qui se détache de l'actine avant la libération des produits de l'hydrolyse. Ainsi, le détachement de l'actine du complexe myosine-ADP- Pi avant la libération des produits de l'hydrolyse, permettrait d'expliquer les effets différents de la concentration en Pi sur l'hydrolyse de l'ATP et la force isométrique.



Schéma 2 : Cycle mécano-chimique non conventionnel proposé par Linari 2010. L'actine peut se dissocier aussi du complexe actine-myosine-ADP- Pi (étape 6) avant la libération séquentielle du Pi puis de l'ADP.

Phosphate et powerstroke

Afin de mieux comprendre les mécanismes responsables du powerstroke, Caremani et collaborateurs ont étudié son couplage avec la libération de Pi sur fibre isolée et pour différents niveaux de force de contraction isotonique (Caremani *et al.*, 2013). Dans cette étude réalisée *in situ*, les auteurs ont imposé des chutes de tension à des fibres par un raccourcissement de la fibre de 6% de sa longueur initiale. Ils ont ensuite mis en relation la vitesse isotonique transitoire avec la concentration en Pi produit. Les auteurs n'ont mesuré aucun effet de Pi sur la vitesse du powerstroke. Sur la base de ces observations ils suggèrent que (1) la présence du Pi dans le site catalytique de la myosine n'est pas nécessaire à l'initiation du powerstroke, (2) la libération du Pi pourrait survenir à n'importe quel moment au cours du powerstroke et (3) à charge élevée, et au cours du powerstroke, la tête de myosine semble être capable de s'attacher sur le prochain monomère d'actine économisant ainsi de l'énergie pendant la contraction (Caremani *et al.*, 2013).

La même équipe a couplé des mesures de vitesses, de force et du nombre de ponts actine-myosine à la libération des produits de l'hydrolyse de l'ATP (Caremani *et al.*, 2015). Durant le raccourcissement à charge élevée (vitesse $\leq 350 \text{ nm.s}^{-1}$), le nombre de pont actine-myosine diminue mais la force par pont demeure constante. A charge faible (vitesse $\geq 350 \text{ nm.s}^{-1}$), la force par pont diminue progressivement avec la charge, et ce, indépendamment de [Pi]. La force et le nombre de ponts sont donc sous la dépendance de la vitesse de contraction, dirigée par le powerstroke. Cette relation a permis de déterminer que le Pi, puis l'ADP sont libérés à des vitesses qui augmentent avec la progression du powerstroke (Caremani *et al.*, 2015). Ainsi, à vitesse de raccourcissement élevée et donc charge faible, la libération de l'ADP se produit à la fin du powerstroke.

L'ensemble de ces données aboutit au consensus suivant : La formation du complexe actine-myosine-ADP-Pi en liaison forte annonce le début du powerstroke. Une fois initié, cela provoque la libération du Pi, puis de l'ADP à des vitesses croissantes avec la progression du powerstroke.

Des données contradictoires

Ces données rapportées, selon lesquelles l'initiation du powerstroke précède la libération du Pi puis de l'ADP ne sont pas en accord avec les résultats récents obtenus sur fragment acto-S1. Un mécanisme différent soutenu par des données cristallographiques combinées à une analyse cinétique a été proposé par l'équipe d'Anne Hudousse (Llinas *et al.*, 2015). Les

auteurs ont montré que contrairement au modèle classique (Geeves & Holmes, 2005; Preller & Holmes, 2013), il n'existe pas de complexe actine-myosine-ADP-Pi en liaison forte avant la libération du Pi (**figure 17**). L'interaction faible actine-myosine induit une modification du domaine switch II qui permet la création d'un tunnel pour la libération du Pi. Switch II contrôlerait donc le lever arm d'une manière fine, et non selon un modèle "on" "off" comme souvent décrit dans la littérature (Reubold *et al.*, 2003). La libération du Pi dans le tunnel ainsi formé serait nécessaire à la fermeture de la pochette de fixation à l'actine à l'origine de la liaison forte actine-myosine. A ce stade, le Pi est libéré et le complexe actine-myosine-ADP se trouve en liaison forte. Le powerstroke peut alors commencer, caractérisé par un mouvement de grande amplitude du lever arm. L'ADP est ensuite libéré, associé à un léger mouvement du lever arm venant terminer le powerstroke, et le complexe actine-myosine alors en rigor est prêt à fixer une nouvelle molécule d'ATP. Ces résultats ont été obtenus en parallèle en sein des myosines V et VI, et des myosines II musculaires. Des structures similaires ont été retrouvées dans ces 3 classes de myosines avec cependant des différences de cinétiques. La vitesse de libération du Pi est plus élevée pour les myosines V et VI comparé aux myosines II. Des mutations spécifiques de la boucle d'activation présente dans le domaine L50, provoquent une diminution drastique de la vitesse de libération du Pi. Ces résultats sont en adéquation avec le fait que cette boucle d'activation est impliquée dans l'initiation de la génération de force (Várkuti *et al.*, 2012).

Figure 17 : Modèle d'initiation du powerstroke par le Pi. La libération du Pi permet la transition de la liaison faible à forte de l'interaction actine-myosine. Une fois en interaction forte (stéréospécifique), le powerstroke est initié, avec un mouvement massif du lever arm. L'ADP est ensuite libéré et le complexe actine-myosine, en rigor, peut recevoir une nouvelle molécule d'ATP. La figure est tirée de Llinas *et al.*, 2015.

La séquence des événements qui constitue le cycle mécano-chimique semble diviser la communauté scientifique qui emploie des méthodes de mesure distinctes et du matériel biologique présentant des degrés d'organisation également différents. Les études récentes instaurent un doute quant aux mécanismes précis de libération du phosphate et de survenue du powerstroke (**figure 18**). Une approche alternative pour comprendre les mécanismes du cycle mécano-chimique serait de mesurer l'activité ATPasique à travers la production de Pi ou d'ADP. Plutôt que de travailler sur des systèmes isolés comme les fragments S1, acto-S1 ou des filaments reconstitués *in vitro* qui paraissent relativement éloignés de la richesse de l'environnement de la contraction en situation physiologique, j'ai choisi de travailler sur le modèle myofibrillaire. Grâce à des techniques d'approche cinétique, j'ai pu appréhender le cycle mécano-chimique à travers l'analyse de l'activité ATPasique et ses adaptations à

l'exercice. La méthode utilisée ainsi que les profils cinétiques typiques font l'objet de la partie suivante.



Figure 18 : Modèles proposés pour l'initiation du powerstroke représentés au sein du cycle mécano-chimique. Selon le modèle classique (en bleu), le powerstroke commence après la formation d'un état d'interaction forte entre l'actine et la myosine, permettant la libération du P_i , puis du phosphate. Selon le modèle proposé par Houdusse pour fragment acto-S1 (en mauve), le powerstroke commence après la libération du P_i , laquelle permet la formation d'un état d'interaction forte entre l'actine et la myosine. Selon ce modèle, le mouvement du lever arm se fait en majeure partie avant la libération de l'ADP à l'ADP state, puis dans une moindre mesure après sa libération grâce à l'ouverture des domaines switch I et P-loop.

1.2. L'activité ATPasique sur myofibrille

1.2.1. La myofibrille comme moyen d'étude

L'interaction actine-myosine peut être étudiée à partir de divers modèles grâce à différentes méthodes. La diffraction aux rayons X et la cristallographie permettent de comprendre les arrangements structuraux à l'échelle atomique, sur protéines purifiées ou fragment S1, dont les connaissances actuelles sont rassemblées dans les revues de Houdusse et Linari (Lombardi *et al.*, 2004; Sweeney & Houdusse, 2010; Llinas *et al.*, 2012). La superfamille des myosines possède des propriétés contractiles et énergétiques différentes. A partir de fragments S1 et de filaments d'actine reconstitués, les multiples travaux réalisés *in vitro* ont permis de nombreuses avancées sur la compréhension de la génération de force par la myosine lors de la contraction. Les revues de Batters et collaborateurs et de Higushi et collaborateurs mettent en lumière le développement de ces méthodes qui ont permis à cette approche réductionniste et comparative d'être aussi fructueuse (Higuchi *et al.*, 2011; Batters *et al.*, 2014). Dans ces études, les données mécaniques (vitesse, force) et structurales issues d'expérimentations réalisées sur fibres et cristaux sont souvent corrélées à des données chimiques (hydrolyse de l'ATP) issues d'expérimentations réalisées sur systèmes distincts. Les myofibrilles permettent le recueil des données mécaniques et chimiques directement, ainsi que la corrélation de ces deux aspects. Elles constituent pour cette raison un bon modèle pour l'étude des interactions actine-myosine. Elles conservent toute la structure sarcomérique native et tridimensionnelle des fibres musculaires ainsi que l'ensemble du système de régulation par le calcium. Ces véritables unités contractiles capables de production de force et de raccourcissement permettent des mesures cinétiques dans des conditions de forces ioniques proches de celles physiologiques en présence ou en absence de calcium (myofibrilles activées ou relaxées, respectivement). Cependant, du fait que les myofibrilles en suspension ne soient pas tenues aux extrémités, leur raccourcissement en conditions d'activation saturées en ATP se fait à vitesse maximale et sans charge donc au-delà d'une véritable situation physiologique. A l'issue de la contraction initiée par le calcium, elles forment alors des agrégats réfringents au microscope optique (Takahashi *et al.*, 1965). Ainsi, depuis les premières mesures réalisées dans les années 1970 (Potter, 1974; Arata, Mukohata, & Tonomura, 1977; Goodno, Wall, & Perry, 1978), il fallut attendre les années 1990 pour développer une situation plus physiologique (Harrington *et al.*, 1990; Harada *et al.*, 1990). La solution a été de prévenir le raccourcissement des myofibrilles par

pontage chimique (cross-linkage). Le pontage consiste à bloquer le raccourcissement des sarcomère par incubation des myofibrilles en présence de 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbonimide (EDC). L'EDC est utilisé pour former des liaisons covalentes entre environ 8% des têtes de myosine et les molécules d'actine voisines pour une durée d'incubation d'1h30 (Herrmann *et al.*, 1993). Les myofibrilles pontées représentent un excellent modèle d'étude de la contraction isométrique dans la mesure où la contraction résiduelle des sarcomères (< 3 nm) est bien inférieure à celle observée en condition isométrique sur fibre musculaire. Elles présentent une cinétique similaire aux myofibrilles non-pontées qui se contractent en conditions isométrique (Herrmann *et al.*, 1993). Par ailleurs, une étude a comparé les profils cinétiques de myofibrilles et de fragments acto-S1, pontés ou non. A 4°C, l'activité ATPasique mesurée à partir de fragments acto-S1 et de myofibrilles présentent aussi des profils cinétiques similaires (Herrmann *et al.*, 1994). Cependant, à 20°C, cette similarité disparaît et des différences apparaissent entre acto-S1 et myofibrilles. Les résultats suggèrent que le facteur limitant du cycle (c'est à dire l'étape la plus lente) n'est pas la même pour les fragments acto-S1 et les myofibrilles à cette température plus élevée. Elle concerne le clivage de l'ATP pour les fragments acto-S1 et la libération des produits de l'hydrolyse pour les myofibrilles et les fibres musculaires. Une comparaison entre myofibrilles, fibres et protéines en solution (fragments S1 et acto-S1) comme modèle d'étude de l'activité ATPasique est détaillée dans la revue de Lionne et collaborateurs (Lionne *et al.*, 2003). Le choix de réaliser les expérimentations à 4°C est guidé par 2 raisons principales. La première est que la machinerie contractile n'est pas altérée à cette température (Brenner *et al.*, 1982), et la seconde est que toutes les cinétiques sont ralenties dans des proportions identiques rendant leur étude plus simple, et surtout plus précise avec nos méthodes d'analyse de cinétique, dont le pas de temps est de l'ordre de la milliseconde. Pour étudier l'activité ATPasique, j'ai donc choisi de travailler sur le modèle myofibrillaire à 4°C grâce aux méthodes cinétiques décrites dans la partie suivante.

1.2.2. Une cinétique très rapide

1.2.2.1. Une méthode pointilleuse

L'étude de l'activité ATPasique de la myosine repose sur l'analyse cinétique de l'évolution des produits d'une réaction chimique au cours du temps. Ici, à partir de myofibrilles, la réaction mesurée est $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$. Cette réaction est réalisée en conditions activées, en présence de calcium, ce qui permet au domaine catalytique de la myosine d'hydrolyser l'ATP et surtout de libérer ses produits rapidement par rapport aux conditions relax en l'absence de calcium. Pour établir une cinétique de production d'ADP ou de Pi, la méthode utilisée est celle du Rapid Flow Quench (RFQ ; **figure 19**). Brièvement, les myofibrilles activées sont mélangées rapidement avec de l'ATP. La réaction est ensuite stoppée par un acide fort au temps t souhaité, et des techniques d'analyses biochimiques sont utilisées pour mesurer la concentration en ADP ou Pi produits. L'expérience est renouvelée pour différents temps d'incubation de la réaction afin de capturer l'ensemble des événements de la cinétique. Cette méthode point par point est longue à réaliser et gourmande en matériel biologique et nécessite de surcroît un grand nombre de précautions. Une fois les mélanges réactionnels collectés, la détermination de la concentration en ADP ou Pi peut se faire selon différentes méthodes. La méthode classique (Reimann & Umfleet, 1978), réadaptée plus tard aux expérimentations sur myofibrilles (Herrmann *et al.*, 1994) consiste en le dosage du phosphate produit à partir d'ATP radioactif ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$), pour lequel l'hydrolyse libère le phosphate marqué. Dans le cadre de mes travaux, une seconde méthode a été employée. Nous avons dosé l'ATP restant et l'ADP formé au cours de la réaction par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) selon la méthode adaptée de Varga et collaborateurs (Varga *et al.*, 2009) qui présente l'avantage d'un grand pouvoir de résolution et de s'affranchir de matériel radioactif. Le dosage des nucléotides met en évidence une cinétique d'apparition du Pi ou de l'ADP total triphasique dont les caractéristiques sont détaillées dans la partie suivante.

Figure 19 : Principe du Rapid Flow Quench. L'action du moteur 1 (drive 1) provoque le mélange des myofibrilles en suspension (myosine en rouge) et de l'ATP (en jaune) au niveau de la chambre de mélange M1. Dans un second temps, par l'action du moteur 2 (drive 2), le tampon d'activation pousse le mélange jusqu'à la seconde chambre de mélange M2 où il est quenché par un acide fort (en bleu). Les quantités d'ATP et d'ADP formées dans le mélange réactionnel sont ensuite dosées par HPLC.

1.2.2.2. La cinétique en trois phases

La cinétique de production d'ADP et de Pi est triphasique (Houadjeto, Barman, & Travers, 1991). Elle est constituée d'une première phase transitoire et exponentielle, appelé Pi-burst (ou ADP-burst) et caractérisée par une constante k_{OBS} et une amplitude A, et de deux phases linéaires d'état stationnaire. L'état stable rapide, dirigé par k_{Fast} (k_F) et l'état-stable lent, dirigé par k_{slow} (k_s ; **figure 20**). La transition de l'état stable rapide à lent intervient au temps t_{Break} (t_B), indicateur de la vitesse de raccourcissement des myofibrilles à charge nulle (V_0) (Lionne, Travers, & Barman, 1996).

Figure 20 : Courbe typique de cinétique de production de Pi total (libre et lié) par tête de myosine obtenue par RFQ à 4°C sur psoas de lapin. La phase transitoire exponentielle dirigée par k_{OBS} n'est pas visible sur cette échelle de temps. On peut repérer la transition de l'état stable rapide à lent à $t_B = 2s$ environ. ATP_c correspond à l'ATP consommé à t_B . La figure est tirée de Lionne *et al.*, 1996.

Le burst exponentiel

Cette première phase transitoire est très rapide. Elle représente la production de Pi (ou d'ADP) durant le premier turn-over (premier cycle mécano-chimique). Son amplitude est donc comprise entre 0 (pas d'hydrolyse) et 1 (1 ATP hydrolysé par tête de myosine). Il est important de noter que le Pi dosé ici est total (Pi libre et Pi lié au complexe actine-myosine-ADP-Pi). Cependant, plusieurs évidences expérimentales issues de la mesure directe de Pi libre grâce à une protéine spécifique qui émet un signal de fluorescence lors de sa fixation avec le Pi (PBP) suggèrent que l'état actine-myosine-ADP-Pi prédomine durant cette phase (Lionne *et al.*, 2002).

L'état stationnaire rapide

Cette phase qui fait suite au Pi-burst correspond aux cycles mécano-chimique lors du raccourcissement des myofibrilles et permet de ce fait d'évaluer l'activité ATPasique de la myosine en condition d'activation maximale (Brune *et al.*, 1994). Au cours de cette phase, les myofibrilles se contractent à vitesse maximale de manière quasi physiologique (Houadjeto *et al.*, 1991). Cette vitesse est très proche de V_0 , la vitesse maximale à charge nulle. Cette phase est dirigée par k_F , qui représente l'activité ATPasique de la myosine et qui

peut être déterminée directement en ajustant sur cette phase une fonction linéaire sur les mesures de production de Pi (ou de l'ADP) au cours du temps. Par ailleurs k_F entretient une relation avec l'ATPc, l'amplitude du Pi burst (ou du l'ADP burst) et t_B de la nature suivante (Lionne *et al.*, 1996) :

$$k_F = (\text{ATPc} - \text{amplitude du Pi burst}) / t_B$$

k_F représente donc le nombre de mole d'ATP hydrolysé par tête de myosine et par seconde, durant l'état stable rapide. L'ATPc et l'amplitude du Pi burst sont indépendants de la longueur initiale du sarcomère pour des valeurs comprises entre 2,7 et 3,5 μm (Lionne *et al.*, 1996). De fait, le produit $k_F * t_B$, est aussi indépendant de la longueur initiale du sarcomère. En revanche, k_F est diminué pour des augmentations de longueurs de sarcomère initiales en raison d'une diminution de la zone de chevauchement entre l'actine et la myosine qui aboutit nécessairement à une réduction du nombre de ponts actine-myosine susceptibles de se former. k_F peut être sensiblement réduit par des concentrations élevées et supra physiologiques en ADP (Lionne *et al.*, 1996). Pour des myofibrilles activées à une température de 4°C, l'étape la plus lente du cycle est celle du powerstroke associée à la libération du Pi (Lionne *et al.*, 1995, 2002).

L'état stationnaire lent

Cette seconde phase linéaire fait suite à la phase rapide et commence à t_B comme nous l'avons évoqué précédemment. Par rapport à la phase rapide, l'état stable lent, dirigé par k_S s'éloigne nettement des conditions physiologiques dans la mesure où les myofibrilles en suspension, n'étant pas tenues à leurs extrémités, entrent dans une phase de sur-contraction. Dans cette phase, les filaments épais viennent buter dans les stries Z. Les myofibrilles sont alors confrontées à une phase de pseudo isométrie, la contraction étant limitée par les résistances passives liées à la structure même des sarcomères. Il est intéressant tout de même de noter que le ratio k_F / k_S , qui atteint une valeur comprise entre 2 et 3, est similaire au ratio $k_F \text{ myofibrilles natives} / k_F \text{ myofibrilles pontées}$. Toutefois du fait de l'absence de véritable intérêt physiologique cette phase, elle n'a pas été étudiée outre mesure lors de mes travaux de thèse.

2. Entraînement en résistance, prenez la force du bon côté

Chacun sait que le muscle strié squelettique est doté d'une grande plasticité. En d'autres termes, lorsqu'il est stimulé, le muscle est capable de s'adapter afin d'optimiser ses aptitudes contractiles. Cette plasticité, qui peut s'exprimer tant au niveau cellulaire (balance hypertrophie / atrophie) que moléculaire, et présente une spécificité en rapport avec la nature des stimuli. Les modifications de contraintes imposées aux muscles peuvent revêtir des formes extrêmement variées et liées aussi bien à une hypokinésie (alitement, microgravité, situations pathologiques etc.) qu'à une hyperkinésie (activité physique, activité professionnelle pénible, entraînement) et ainsi, améliorer ses fonctions contractiles telles que la force générée, la vitesse de contraction ou l'endurance. Ici, nous nous intéressons aux effets de l'entraînement et plus particulièrement de l'entraînement en résistance. Il existe plusieurs grandes catégories d'exercices : exercices de force, qui sont réalisés entre 80% et 100% de la force maximale, les exercices d'endurance, réalisés quant à eux une intensité inférieure à 60% et enfin, les exercices de résistance qui sont réalisés à une intensité comprise entre 60% et 80%. Il est aisé de comprendre que plus l'exercice est réalisé à une intensité faible, plus il peut être tenu longtemps. Ainsi, de manière intuitive, on peut en déduire que les deux principaux facteurs permettant de décrire et de quantifier simplement un exercice physique, sont l'intensité et la durée.

Dans le cadre de mes recherches, je me suis intéressé aux effets de l'entraînement en résistance sur les adaptations musculaire chez l'animal, selon un exercice de type escalade. Il existe néanmoins de nombreux modèles d'entraînement en résistance chez le rat. L'objet de la partie suivante est d'opérer un rapide tour d'horizon des modèles existant et de préciser les raisons de notre choix. Dans un second temps, les adaptations musculaires en réponse à cet entraînement seront détaillées.

2.1. Les modèles d'entraînement en résistance chez le rat

Avant tout, pourquoi entraîner un animal ? Même si la question peut apparaître naïve, les avantages du modèle animal par rapport à l'expérimentation humaine sont multiples : la complexité des mesures biologiques, que ce soit des mesures sanguines, endocrines, signalétiques ou musculaires rend les prélèvements d'échantillons difficiles et très invasifs. La structure musculaire et ses caractéristiques contractiles étant extrêmement conservées chez les mammifères, les travaux conduits chez le rongeur sont riches d'enseignements.

2.1.1. L'entraînement par mimétisme

Depuis plus de 45 ans, différents modèles d'entraînement ont été proposés. Ces méthodes sont utilisées afin d'induire une hypertrophie musculaire et de tenter de comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents mis en jeu mais sont essentiellement de type contraint.

Ténatomie des synergistes

Goldberg a développé une méthode chirurgicale en 1968 consistant en une ténatomie unilatérale (ablation des tendons) du muscle *gastrocnemius*. 6 jours après l'opération, une hypertrophie des muscles soléaire et *plantaris* de 36% et 15%, respectivement a été observée (Goldberg, 1968). Cependant, en raison de la sur-sollicitation permanente, les gains de masse musculaire sont très rapides les jours suivant l'ablation puis atteignent un plateau 2 semaines après la chirurgie. De plus, cette sur-sollicitation permanente ne reflète pas une activité physique qui est réalisée lors de sessions d'entraînement séparées dans le temps. Ainsi cette méthode ne peut pas être utilisée pour mimer des entraînements sur le long terme ni même pour les entraînements à intensité croissante qui permettent de générer des hypertrophies encore plus marquées ainsi que des gains de force.

Stimulations électriques

Dans ce modèle d'entraînement par mimétisme, les rats sont anesthésiés et une de leur patte arrière fixée sur une plaque métallique immobile (Wong & Booth, 1988). Les muscles sont ensuite stimulés électriquement. Ce modèle n'est pas très efficace et ne provoque qu'une légère hypertrophie. Il fallut attendre 1999 pour que Baar et Esser montrent une augmentation de P70S6K phosphorylé (effecteur de MTOR) induite par ce modèle (sensiblement modifié) démontrant ainsi son effet sur la synthèse protéique (Baar & Esser,

1999). La même année, proposa d'affiner encore ce modèle en laissant la patte, lestée, libre (Goldspink, 1999). Ainsi, lors de la stimulation électrique, le muscle pouvait se contracter en condition concentrique. Ceci eu pour effet d'augmenter la réponse anabolique à l'électrostimulation. De plus, ce modèle permet de mesurer la force maximale tétanique et d'adapter l'intensité électrique. Bien qu'il permette de mesurer l'effet aigue et à court terme de l'activité physique sur le muscle squelettique, il parait difficile d'évaluer l'effet d'un entraînement progressif et chronique sur un animal anesthésié.

En 2006, Haddad et collaborateurs ont proposé un entraînement en résistance, sur animal anesthésié, qui faisait suite à une période de suspension du train arrière de 6 jours (HS pour Hindlimb Suspension en anglais) (Haddad *et al.*, 2006). L'objectif était de vérifier les effets anti-atrophiques de l'électrostimulation. Brièvement, des électrodes étaient placées à proximité du nerf sciatique de l'animal anesthésié. Les séances d'entraînement consistaient en 4 séries de stimulations électriques espacées de 5 minutes. Chaque série étant composée elle-même de 10 contractions maximales isométriques de 2 secondes et espacée de 20 secondes. Ainsi, l'entraînement durait environ 30 minutes et le muscle était activé environ 80 secondes en temps cumulé. Cet entraînement que l'on peut qualifier de passif a abouti à des résultats mitigés. Bien que la perte de masse musculaire due à la suspension soit limitée par l'entraînement, la concentration en protéines musculaires était plus faible chez les animaux HS entraînés que chez les animaux HS sédentaires. L'utilisation de ce modèle semble inappropriée pour simuler les effets de l'entraînement en force ou en résistance.

Restriction chronique de l'afflux sanguin aux muscles

Cette méthode a été rapportée pour la première fois chez l'animal par les professeurs Shigeo Kawada et Naokata Ishii en 2005 (Kawada & Ishii, 2005). Elle consiste simplement en l'obstruction chirurgicale de plusieurs veines du membre inférieur afin d'induire une hypertrophie. 14 jours post-opération, les animaux présentaient une hypertrophie de 10% du muscle *plantaris* (poids sec) associée à une augmentation de la concentration en protéine myofibrillaire de 23%. Bien qu'il soit difficile d'évaluer précisément les effets délétères inhérents à un tel modèle en raison de l'absence d'un protocole détaillé publié (choix des veines obstruées par exemple), il semblerait qu'il simulerait un entraînement en induisant un shift phénotypique vers les fibres peu oxydatives (diminution des MHC1 et MHC2A) (Kawada & Ishii, 2008). Cependant, aucune donnée sur les effets à long terme n'a été publiée. Autant d'interrogations qui nous font préférer les modèles plus physiologiques basés sur un réel entraînement volontaire chez le rat.

2.1.2 L'entraînement volontaire avec ou sans chocs électriques

Dans le cadre de l'exercice effectif par opposition aux modèles décrits ci-dessus, la méthode la plus classique consiste à imposer l'exercice ou à tenter de motiver l'animal pour qu'il le réalise. L'évitement de choc électrique est un stimulus plus efficace que la récompense alimentaire après jeûne qui peut réduire les performances dans les exercices de temps limite jusqu'à 60% (Timson, 1990). L'activation électrique directe des aires motrices cérébrales apparaît également très efficace mais la quantification de la quantité et de l'intensité de l'exercice reste difficile par cette méthode de développement de la force.

Extension plantaire, haltérophilie et squat

Dans ce modèle, des rats âgés (2 ans) doivent effectuer une extension plantaire afin d'atteindre de la nourriture (Klitgaard, 1988). Durant cette extension, l'animal soulève des charges additionnelles en passant à travers un cylindre étroit et lesté pour atteindre la nourriture, située à sa verticale. Ce modèle physiologique, sans aucune stimulation électrique, est un des premiers à avoir été proposé. Cependant, les gains de masses musculaires sont limités et nécessitent un entraînement long. Seulement 24% de gain de masse pour le muscle *plantaris* a été observé après 36 semaines d'entraînement. Effectué chez le rat jeune, les gains atteignent 13% pour ce même muscle à l'issue de 13 semaines d'entraînement (Zanchi *et al.*, 2009). Cette hypertrophie est associée à une diminution de l'expression des atrogènes (MuRF-1 et Atrogin-1) et des ubiquitines ligases impliquées dans la protéolyse. Ainsi, même si la balance protéique semble perturbée (bien que les flux de synthèse n'aient pas été mesurés) ce protocole reste limité dans la mesure où il nécessite des temps d'entraînement très longs et induit des gains de masse relativement faibles.

Dans un modèle inspiré de l'haltérophilie, les rats sont équipés d'un gilet lesté avec des charges croissantes (jusqu'à 75% de la charge maximale), puis une stimulation électrique au niveau de la queue les incitait à sauter (Tamaki, Uchiyama, & Nakano, 1992). Ainsi, les animaux stimulés réalisent leur squat sollicitant ainsi leurs membres inférieurs. A raison de 4 à 5 séances par semaine pendant 12 semaines, les animaux présentaient une hypertrophie du muscle *plantaris* de l'ordre de 12% comparé aux animaux sédentaires. En revanche, aucun gain supplémentaire n'était observé comparé au groupe entraîné en sprint sur tapis roulant pendant la même durée.

2.1.3. Le modèle d'escalade : De Yarashesky à Bègue

Yarashesky et collaborateur sont les premiers à avoir imaginé un modèle d'entraînement où les animaux doivent grimper volontairement une grille verticale de 40 cm de haut afin d'obtenir de la nourriture en récompense (Yarasheski, Lemon, & Gilloteaux, 1990). Dans ce modèle initial, les animaux effectuent 20 répétitions avec une charge additionnelle croissante attachée à la base de la queue. Cette charge est de 60 g au 6^{ème} jour puis incrémentée de 30 g tous les 3 jours. Malgré une durée d'entraînement de 8 semaines, les auteurs n'ont mesuré qu'un gain de masse limité que ce soit sur le *rectus femoris* ou même sur le *biceps*, un des principaux muscles impliqués dans l'activité d'escalade. Ces gains étaient accompagnés d'un shift phénotypique en faveur des MHC2A associé à une diminution de l'expression des MHC1. Ce modèle a été adapté par Duncan et collaborateurs qui, après 26 semaines d'entraînement, faisait soulever à leurs rats, sur 40 cm également, une charge pouvant atteindre 140% de leur masse corporelle soit environ 800 g (Duncan, Williams, & Lynch, 1998). Cet entraînement plus intense a déterminé des gains de masses relatives (poids du muscle/poids de corps) pour les muscles *extensor digitorum longus* (EDL) et soléaire ainsi qu'une hypertrophie cardiaque. Plus récemment, en 2004, une étude repris les bases de cet entraînement progressif mais cette fois sur 8 semaines et avec une échelle de 1,1 m. À l'issue de l'entraînement, les rats étaient capables de soulever jusqu'à 287% de leur poids de corps. Ces gains de performance étaient associés à une augmentation de 23% du poids absolu du *flexor hallucis longus* (FHL) et d'une augmentation en protéines myofibrillaires et totales de 24% comparé au groupe contrôle (Hornberger & Farrar, 2004). Ces travaux montrent bien que l'entraînement en résistance selon un modèle d'escalade avec charges additionnelles induit des effets musculaires. Cependant, les effets décrits ci-dessus demeurent modestes et leurs amplitudes variables d'une étude à une autre. Cela est dû à deux facteurs principaux avec en premier lieu la charge d'entraînement. Les rats sont des animaux naturellement grimpeurs. De fait, leurs capacités adaptatives à l'exercice sont très importantes. Il semblerait alors que les charges imposées lors des premiers protocoles proposés soient insuffisantes pour observer une réponse morphologique marquée. Une ébauche de cette réponse est soulignée par Hornberger et Farrar dans leur étude de 2004, grâce à un protocole plus intense (charges plus lourdes, échelle plus haute) repris également par Lee et al. (Lee *et al.*, 2004). Le deuxième facteur limitant est le choix des muscles étudiés. Dans les études citées, les muscles mesurés sont presque exclusivement insérés sur la patte arrière. Cela paraît un choix surprenant et même contradictoire avec les données

connues sur l'escalade. En effet, cette activité physique fait intervenir principalement les muscles du membre supérieur avec en premier lieu les fléchisseurs des doigts, les fléchisseurs du bras et les muscles de l'épaule (Deyhle *et al.*, 2015). Cette réflexion nous amène au dernier modèle d'escalade proposé par Begue et collaborateurs en 2013 (Begue *et al.*, 2013). Leur protocole vient combler les lacunes énoncées plus haut. Premièrement, les rats effectuent 10 répétitions sur une échelle de 1,1 m avec des charges additionnelles progressives allant de 50% à 210% de poids de corps à l'issue des 10 semaines d'entraînement. Les rats étaient alors capables de soulever une charge de 350% de leur poids de corps soit plus de 1,2 kg. Cet entraînement, qui à première vue semble difficile à supporter pour l'animal n'est en réalité pas traumatisant pour ce dernier. En effet, lors des séances d'entraînement, les animaux ne grimpaient que s'ils le voulaient. L'expérimentateur arrêta dès que l'animal refusait de réaliser l'exercice spontanément. Le deuxième point fort de ce protocole, venant combler la 2^{ème} limite déjà citée, est le choix du muscle étudié. Le *Flexor Digitorum Profundus* (FDP), peu étudié dans la littérature, est pourtant le principal muscle fléchisseur de la patte avant et majoritairement impliqué dans la flexion des doigts (MacLeod *et al.*, 2007; Philippe *et al.*, 2012). Begue et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de 100% de la surface de section (CSA) des fibres principales qui composent ce muscle mixte associée à une diminution de l'expression des fibres lentes et rapides (MHC1 et MHC2X respectivement) et une augmentation des fibres intermédiaires MHC2A, effet caractéristique de l'entraînement en résistance (Begue *et al.*, 2013).

En résumé, dans le cadre de mes recherches, le protocole de Begue et collaborateurs associé à l'analyse des muscles du membre supérieur m'ont semblé être les choix les plus pertinents pour détailler les adaptations musculaires faisant suite à l'entraînement en résistance. Ces propriétés de l'entraînement en résistance sur le tissu musculaire font l'objet de la partie suivante.

2.2. La plasticité des fibres musculaires

Inutile de rappeler qu'une des principales propriétés du muscle strié squelettique est sa capacité à s'adapter aux stimulations qu'il reçoit. Ainsi, la pratique régulière d'une activité physique induit des adaptations musculaires qui nous permettent de courir plus vite ou plus longtemps, de sauter plus haut, de soulever des charges plus lourdes ou encore de nager plus rapidement. Intuitivement, on comprend que pour une stimulation donnée, la nature de l'adaptation sera spécifique. De la même manière qu'un sprinter aura du mal à finir un marathon en tête, un marathonien pourra difficilement terminer un 100 en moins de 10 secondes alors que dans les 2 cas, les mêmes groupes musculaires sont mis en jeu. Au-delà de l'apprentissage du geste sportif, les adaptations permettant de tels niveaux de performance sont de deux natures bien distinctes. Premièrement, nous avons des facteurs nerveux. Le cerveau commande la contraction musculaire par l'intermédiaire des neurones moteurs qui partent des différentes aires motrices du cortex cérébral pour arriver jusqu'aux muscles auxquels ils sont en contact grâce à la plaque motrice, appelée également jonction neuro-musculaire. C'est à ce niveau qu'interviennent les premières adaptations, particulièrement rapides. Pucci et collaborateurs ont montré une augmentation de la force de contraction volontaire maximale (force MCV) de 35% après 9 séances d'entraînement en résistance étalées sur 3 semaines, alors que les fréquences de décharge des motoneurones n'étaient pas augmentées (Pucci, Griffin, & Cafarelli, 2006). Les auteurs suggèrent d'autres mécanismes adaptatifs tels qu'une augmentation du nombre d'unités motrices recrutées et/ou une meilleure synchronisation des unités motrices lors de la contraction. Néanmoins, la force MCV prend en compte à la fois les adaptations neurales et musculaires. Afin de pouvoir identifier les 2 individuellement, Duchateau et Hainaut ont comparé la MCV force avec la force maximale tétnique. Cette force tétnique est mesurée après électrostimulation surimposée à la contraction maximale volontaire, permettant ainsi de s'affranchir d'un éventuel déficit de la commande motrice ou d'autres aspects nerveux. La différence de gain entre la MVC force (+22%) et la force tétnique (+15%) suggère que 7% de l'adaptation à l'entraînement est d'ordre nerveux et le reste d'ordre purement musculaire (Duchateau & Hainaut, 1988).

Les adaptations à l'exercice sont donc de nature nerveuses, mais aussi et surtout d'ordre musculaire, et c'est ce qui nous intéresse ici. Ces adaptations musculaires peuvent être regroupées en deux grandes catégories distinctes : Les adaptations d'ordre quantitatives

venant modifier la structure du muscles (hypertrophie, changement phénotypiques), et les adaptations plus fines, d'ordre qualitative venant optimiser la fonction musculaire pour une isoforme de fibre donnée.

2.2.1. Adaptations quantitatives, à l'échelle musculaire

Une grande partie des adaptations musculaires apparaît déjà à l'échelle macroscopique. A ce niveau, je distingue deux phénomènes adaptatifs distincts que sont l'hypertrophie et les changements phénotypiques. Bien que ces derniers soient liés à des mécanismes moléculaires d'ordre qualitatif, j'ai choisi de les classer parmi les adaptations quantitatives car je m'intéresserai peu aux mécanismes responsables du shift phénotypique, mais au contraire, aux effets de ces changements de proportions en isoformes de fibres sur le phénotype contractile.

2.2.1.1. L'hypertrophie

Définitions et mécanismes

L'hypertrophie, est définie par le dictionnaire Larousse comme représentant une augmentation de volume d'un tissu ou d'un organe, due à une augmentation du volume de ces cellules. Dans le domaine de la physiologie de l'exercice, elle peut être caractérisée effectivement par un gain de volume apprécié soit au travers de la surface de section moyenne des fibres musculaires, mais parfois également par un gain de masse musculaire. La différence dans les modes d'évaluation est ténue, dans la mesure où l'un est nécessairement corrélé avec l'autre et qu'ils résultent tout deux d'un déséquilibre de la balance protéique en faveur de la synthèse. En réponse à un exercice isolé, la synthèse protéique est stimulée et persiste jusqu'à 48 h dans le décours de l'entraînement (Phillips *et al.*, 1997). La synthèse est également accrue par une supplémentation alimentaire en plus de l'effet dû à l'entraînement. En effet, la prise de protéines de lait [80% de caséine et 20% de protéines sérique (whey proteine en anglais) pour le lait de vache), de protéines de soja (Biolo *et al.*, 1997; Wilkinson *et al.*, 2007), d'acides aminés essentiels (Tang *et al.*, 2009) et notamment de leucine (Crozier *et al.*, 2005) ou de son métabolite la beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) (Wilkinson *et al.*, 2013), potentialise l'effet de l'entraînement sur la synthèse protéique.

Cependant, d'autres mécanismes interviennent également dans la mise en place de l'hypertrophie. En effet, le muscle contient un pool de cellules satellites sous la membrane basale cellulaire. Ces cellules, une sous-population de cellules souches, présentes chez l'adulte possèdent la capacité de se différencier en cellules musculaires. Ainsi, sous l'effet de contraintes mécaniques ou de blessures, elles peuvent fusionner avec des fibres déjà existantes, déterminant ainsi une augmentation du nombre de noyau et du volume de la fibre aboutissant à l'hypertrophie. Le domaine myonucléaire (volume cytoplasmique sous la dépendance d'un noyau) reste relativement constant. On comprend aisément que les phénomènes de synthèse protéique et de fusion cellulaires travaillent en synergie. En effet, lorsque la cellule possède plus de matériel génétique, elle présente une plus grande capacité à contrôler et synthétiser de nouvelles protéines musculaires.

Bien que le lien entre fusion cellulaire et hypertrophie ne soit plus à prouver, le caractère indispensable de son implication reste sujet à controverse. En effet, dans une étude de 2011, les auteurs ont déplété de plus de 90% le pool de cellules satellites par injection de tamoxifène chez des souris Pax7-DTA. Après ablation des synergistes du *plantaris*, ils ont observés la même hypertrophie que chez les souris sauvages de leur groupe contrôle (McCarthy *et al.*, 2011). Des résultats similaires ont été obtenus chez la même lignée de souris Pax7-DTA montrant que les cellules satellites n'étaient pas nécessaires pour le recouvrement de la masse musculaire après atrophie (Jackson *et al.*, 2012). Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus par Petrella et collaborateurs sur modèle murin qui suggèrent que chez l'Humain, l'incorporation de nouveaux noyaux est requise pour induire une hypertrophie au sein des cellules musculaires (Petrella *et al.*, 2006, 2008). En 2014, Bellamy et collaborateurs ont montré qu'en conditions physiologiques chez l'Humain, l'ajout de nouveaux noyaux aux fibres musculaires par fusion de cellules satellites est un processus important dans la régulation de l'hypertrophie. Ces auteurs ont formulé une hypothèse explicative de manière très diplomate, en proposant que chez l'animal déplété en cellules satellites, des mécanismes compensatoires viendraient contrebalancer l'absence de cellules satellites dans les processus hypertrophiques, dans la mesure où ils ne se trouvent pas en conditions physiologiques mais que les animaux étaient placés dans une situation de surcharge extrême (Bellamy *et al.*, 2014). Le caractère indispensable ou non des cellules satellites pour la mise en place de l'hypertrophie est discuté dans une revue récente de la littérature (Blaauw & Reggiani, 2014).

Hyperplasie

Il existe aussi un autre avenir pour les cellules satellites des muscles striés. Au lieu de fusionner avec les myofibrilles déjà existantes, elles pourraient également fusionner entre elles afin de donner naissance à des myotubes, qui se différencient ensuite en nouvelles fibres sous l'influence de facteurs de transcriptions. Cependant, très peu d'études ont étudié l'hyperplasie dans le cadre de l'entraînement en résistance. Une étude sur des jeunes haltérophiles amateurs montre qu'après un entraînement en force pendant 12 semaines, aucune augmentation du nombre de cellules musculaires n'était observée alors que les gains de CSA et de formation de capillaires sanguins étaient significatifs (McCall *et al.*, 1996). Il est à noter toutefois que les conditions d'observation de l'hyperplasie n'étaient certainement pas optimales dans la mesure où il s'agissait d'athlètes déjà entraînés et que leur possibilités de développer de nouvelles adaptations étaient beaucoup plus réduites que pour des sédentaires jeunes et actifs. Cependant, dans certaines conditions extrêmes, les gains de CSA des muscles hypertrophiés sont nettement supérieurs aux gains de CSA des fibres qui les composent. C'est le cas des culturistes, chez qui cette différence de gain pourrait être expliquée par un changement de structure du muscle, une augmentation en contenu non-protéique, on encore une hyperplasie (D'Antona *et al.*, 2006). Sur la base d'images obtenues en microscopie électronique, Kondalenko et collaborateurs avaient déjà suggéré un mécanisme d'hyperplasie chez des athlètes soumis à de grosses charges d'entraînement (Kondalenko, Sergeev, & Ivanitskaia, 1981). Par ailleurs, des mesures post mortem révèlent une variabilité interindividuelle dans le nombre de fibre musculaire par muscle chez l'Humain, variabilité qui pourrait être expliquée par des mécanismes d'hyperplasie et cela d'autant plus que la formation de nouveaux myotubes a déjà été associée à l'activité des cellules satellites chez l'Humain (Abernethy *et al.*, 1994). La question de l'existence d'une hyperplasie en réponse à de fortes sollicitations mécaniques demeure toutefois très controversée chez l'Humain.

L'entraînement en résistance induit une hypertrophie marquée

L'hypertrophie représente un des effets caractéristiques de l'entraînement en résistance. Il a été montré par exemple, que 2 semaines d'entraînement en résistance de type escalade avec charges additionnelles étaient suffisantes pour induire une augmentation de la CSA de 49% des MHC2X chez le rat, laquelle hypertrophie atteignait 88% pour ces mêmes fibres après 4 semaines toujours pour le muscle FDP comparé aux contrôles sédentaire d'âge équivalent (Begue *et al.*, 2013). A bout des 10 semaines d'entraînement, l'hypertrophie touchait tous

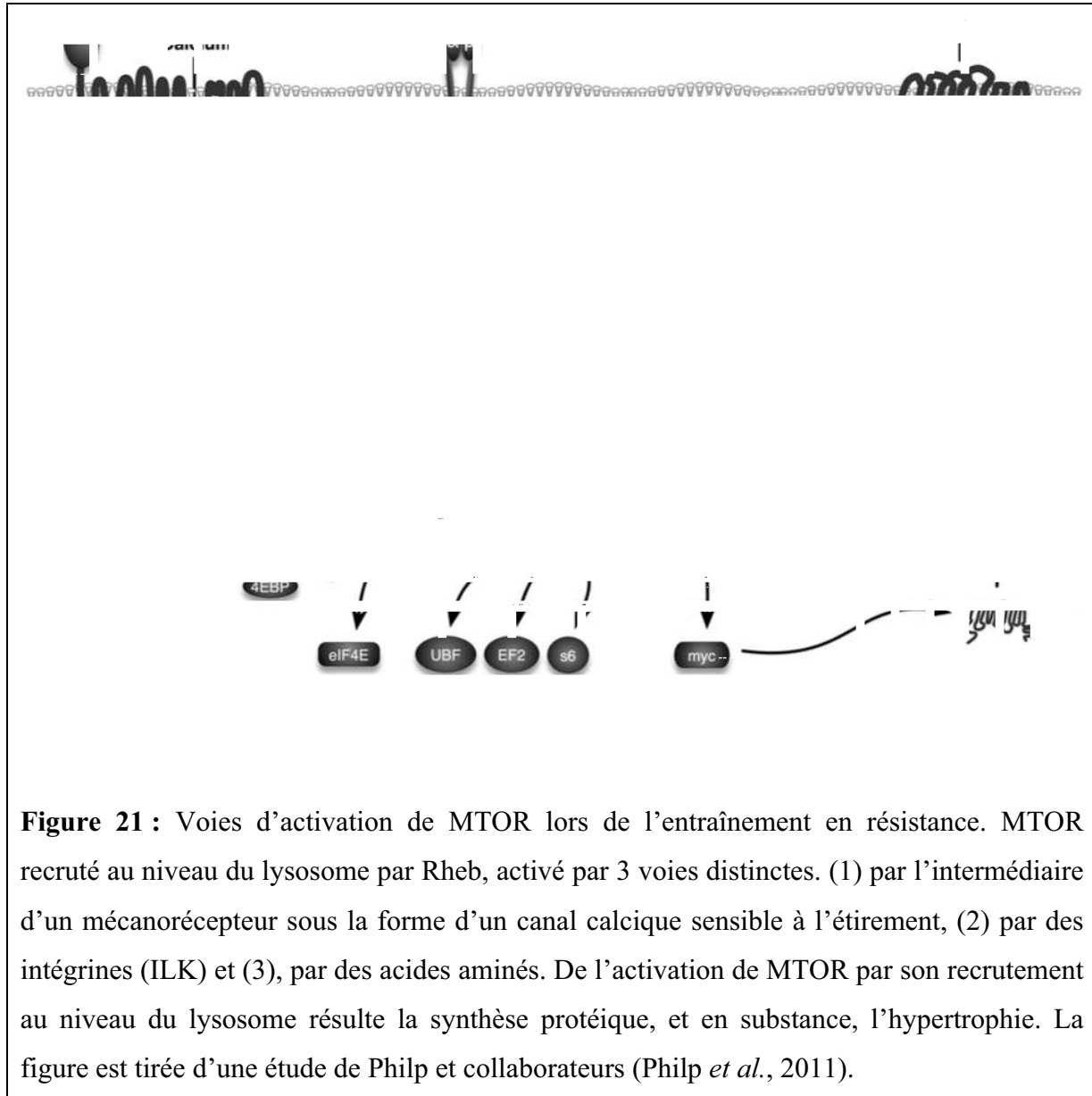
les types de fibres (MHC1, MHC2A et MHC2X). De nombreux facteurs tels que les caractéristiques de charge d'entraînement en termes d'intensité, durée, fréquence ainsi que le régime de contraction mis en jeu modulent le développement de l'hypertrophie et en particulier le degré d'activation de mécanismes cellulaires de synthèse protéique avec MTOR comme régulateur majeur.

Enzyme MTOR, un rôle majeur dans l'initiation de l'hypertrophie

MTOR est une sérine/thréonine kinase qui existe notamment dans la cellule musculaire sous la forme de 2 complexes, MTORC1 et MTORC2 (respectivement MTOR Complex 1 et 2). Dans le cas de l'entraînement en résistance, l'activité de MTORC1 est augmentée, comme en atteste l'accroissement de la forme phosphorylée de S6K, un effecteur de MTOR, toujours visible après 6 semaines d'entraînement (Baar & Esser, 1999). Toujours dans le contexte de l'entraînement en résistance, le rôle de MTORC1 comme initiateur des processus hypertrophiques a été montrée chez le rongeur (Baar & Esser, 1999), et plus récemment chez l'Humain (MacKenzie *et al.*, 2009). Ces données révèlent ainsi le rôle fondamental de MTOR dans la prise de masse musculaire induite par l'entraînement en résistance. Classiquement, MTOR est activé par PI3K par l'intermédiaire de facteurs de croissance. Cependant, l'exercice de résistance stimule MTOR indépendamment de PI3K (Philp, Hamilton, & Baar, 2011). L'exercice activerait un mécanorécepteur (canal calcique dépendant de l'étirement musculaire) qui phosphorylerait TSC2. A son tour, TSC2 phosphorylé se lierait à la protéine 14.3.3 et se détacherait de MTOR et de son activateur Rheb. De cette manière, Rheb serait activé et stimulerait MTORC1 en le recrutant au niveau du lysosome, induisant la synthèse protéique et l'hypertrophie. Par ailleurs, lors de l'exercice de résistance, la dissociation de TSC2 n'est pas le seul mécanisme d'activation de MTOR. L'exercice induit une augmentation des concentrations en leucine et glutamine dans le muscle (Biolo *et al.*, 1995). Ces acides aminés sont connus pour activer MTORC1 par l'intermédiaire des RagGTPases et ainsi, augmenter la synthèse protéique (Crozier *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008).

En résumé, au cours de l'entraînement en résistance, l'activation de MTOR est directement liée à l'hypertrophie. Les voies d'activations de MTOR à l'exercice sont multiples et concomitantes avec majoritairement une activation par l'intermédiaire des acides aminés (leucine et glutamine), des intégrines et/ou d'un mécanorécepteur (canal calcique) sensible à

l'étirement (**figure 21**). Se référer à Schiaffino et Sandri pour un revue de synthèse sur le rôle central de MTOR dans l'équilibre de la masse musculaire (Schiaffino *et al.*, 2013).



Programmes de RE

Les gains de masse musculaire induit par l'entraînement en résistance, reflète de l'augmentation de la synthèse protéique, résultent de l'ajout de nouveaux sarcomères en parallèle au sein de la myofibrille et augmentent le volume musculaire (Schoenfeld, 2010). En effet, une augmentation de plus 50% de la CSA a été observée après 16 semaines

d'entraînement en résistance de type presse chez l'Humain (Petrella *et al.*, 2008). Cependant, de nombreux paramètres dans la planification du protocole d'entraînement viennent moduler cette réponse hypertrophique. Ainsi, le type d'exercice, l'importance des charges maximales, le nombre de séries et de répétitions par série, et la longueur des temps de repos entre les séries sont autant de variables modifiant la réponse hypertrophique. Certains entraînements comportant un nombre relativement réduit ($n \ll 12$) de répétitions d'exercices à charge très lourde favorisent particulièrement le développement de la force. Ces exercices sont extrêmement prisés notamment par les haltérophiles. D'autres exercices favorisent plutôt la vitesse de contraction notamment ceux réalisés à charges légères. Les exercices à charge optimale (aux alentours de 50% de la charge maximale) sont quant à eux plus favorables au développement de la puissance musculaire. Les exercices qui seraient optimum pour obtenir des gains masse musculaire comme peuvent l'attendre les culturistes ne font pas encore l'objet d'un consensus. Au début de l'entraînement avec des charges additionnelles, tous les exercices semblent déterminer une hypertrophie dans des proportions assez similaires. L'effet du régime d'action musculaire, (isométrique ou anisométrique) ainsi que le temps dévolu à chacun de ces régimes au sein même des mouvements de renforcement musculaire ou de musculation ne semblent pas présenter d'effet déterminant. Ainsi, une étude récente a montré que les durées d'exercice comprises entre 0,5 s et 8 s provoquaient une hypertrophie similaire pourvu qu'ils soient réalisés de manière maximale à chaque fois (Schoenfeld, Ogborn, & Krieger, 2015b). De la même manière, l'importance des charges et donc des vitesses de raccourcissement n'avaient pas d'effet notable sur l'hypertrophie. Deux groupes ont été suivis pendant une période totale de 8 semaines. Un groupe réalisait l'entraînement à faible charge (30-50% de la charge maximale) et l'autre à charge élevée (70-80% de la charge maximale). A l'issue du protocole, les 2 groupes montraient une hypertrophie similaire, avec cependant, un gain de force plus élevé pour le groupe entraîné à charge élevée (Schoenfeld *et al.*, 2015a), le principe de spécificité s'exprimant. Cependant, une intensité inférieure à 65% de la charge maximale semble insuffisante pour induire une hypertrophie (McDonagh & Davies, 1984). Souza et collaborateurs se sont intéressés à l'importance de temps de repos entre les séries. Ils ont montré chez le rat qu'une période de repos de 30 secondes lors d'un exercice de résistance progressif (sauts avec charges additionnelles) provoquait une diminution de la CSA de 16,6% du muscle *plantaris* comparé aux rats contrôles, associée à une diminution du poids relatif du muscle (De Souza *et al.*, 2011). Ces observations morphologiques étaient accompagnées d'une sur-activation de MAFbx, marqueur de la voie catabolique du système

ubiquitine protéasome (UPS), et d'une régulation négative du facteur de croissance IGF-1. Ces résultats suggèrent qu'un temps de repos trop court induit un déséquilibre de la balance protéique en faveur de la dégradation protéique. La sur-expression de MAFbx observée est liée à une régulation positive de FoxO, facteur de transcription central dans les processus de dégradation protéique (Sanchez, Candau, & Bernardi, 2014) lui-même activé par l'AMPk (AMP-activated kinase), senseur énergétique de la cellule (Sanchez *et al.*, 2012).

La restriction de l'afflux sanguin permet de maintenir une hypertrophie tout en diminuant l'intensité de l'entraînement

Dans certaines situations, l'entraînement à charge très élevée est déconseillé. Dans le cadre de la réhabilitation par exemple, le sujet doit effectuer des exercices à charges modérées, et les accroître progressivement, afin de ne pas dépasser les contraintes mécaniques acceptables pour les chaînes musculaires en cours de reconditionnement. Afin de favoriser l'hypertrophie, ou même de limiter la perte de poids et de force, une combinaison d'exercices en résistance à charges modérées et de limitation du retour veineux peut constituer un bon compromis. De nombreuses études récentes ont montré qu'un entraînement en résistance à faible charge (20-50% de la charge maximale) associé à une occlusion du retour veineux d'une pression comprise entre 110 et 200 mmHg déterminait une hypertrophie similaire à un exercice à charges élevées et sans occlusion. Takarada et collaborateurs ont montré que l'entraînement en résistance réalisé à charge intermédiaire (50% ou moins de la charge maximale) associé à l'occlusion veineuse induisait une hypertrophie supérieure à celle liée à l'entraînement seul réalisé à faible charge (Takarada, Sato, & Ishii, 2002) et similaire à celle liée à l'entraînement seul à charge élevée (> 70% de la charge maximale) (Takarada *et al.*, 2000). Ces résultats ont été confirmés par Farup et collaborateurs en 2015 qui montrent des résultats similaires entre les 2 protocoles (entraînement en résistance à charges élevée *vs.* entraînement en résistance à charge faible + occlusion veineuse) testés respectivement sur les jambes droite et gauche de chacun des sujets (Farup *et al.*, 2015). Cependant, il existe des mécanismes de communication, ne serait-ce que par voie humorale entre les membres inférieurs droits et gauches, qui seraient de nature à expliquer cette similarité de réponse entre les deux jambes. En effet, lorsque l'on sollicite un membre valide alors que l'autre est plâtré (ou simplement immobilisé par une autre technique), ce dernier voit sa perte de force et de volume réduit par rapport à un contrôle plâtré et non sollicité en controlatéral (Farthing, Krentz, & Magnus, 2009).

La restriction de l'apport sanguin combinée un exercice en résistance à charge modérée semble favoriser l'hypertrophie. Les mécanismes impliqués sont liés à une activation plus intense des fibres musculaires par les motoneurones (Yasuda *et al.*, 2009), l'activation du complexe mTORC1 et de la synthèse protéique (Fry *et al.*, 2010) ou la prolifération de cellules souches qui permettent l'ajout de nouveaux noyaux dans les cellules musculaires (Nielsen *et al.*, 2012). Cette méthode combinée permettrait surtout de pouvoir réaliser un exercice à charge modérée tout en induisant des gains de masse similaires à l'entraînement de résistance traditionnel réalisé à charge élevée. Cela pourrait être une solution pour les athlètes ne pouvant pas subir de trop grosses contraintes mécaniques ou les personnes en réhabilitation. Une récente revue de la littérature détaille les différentes méthodes de restriction de flux sanguin ainsi que les pressions appliquées et discute des éléments clés (Scott *et al.*, 2015).

2.2.1.2. Changement de typologie

Définition et mécanismes

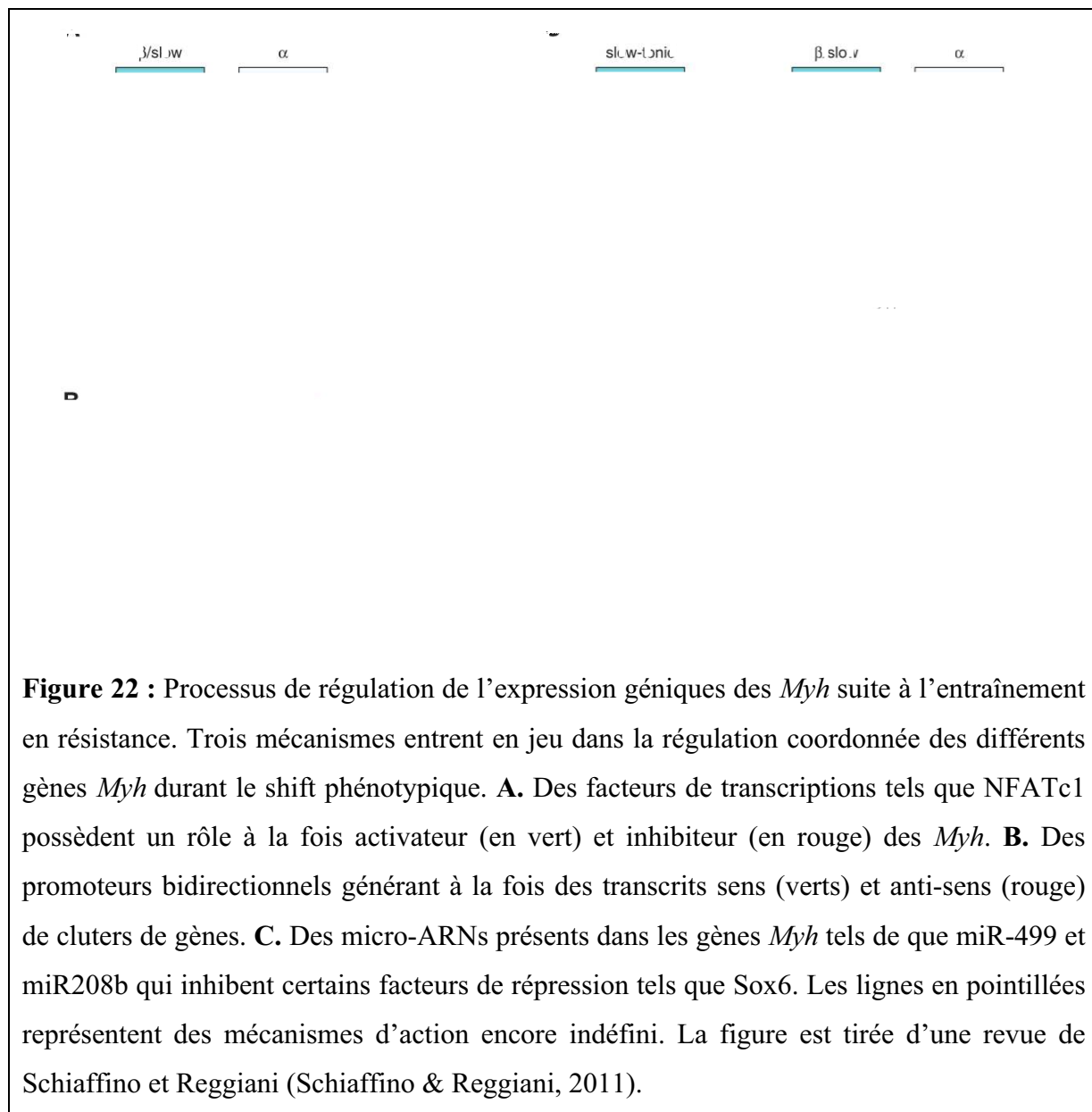
Au sein du règne des mammifères, le muscle est un tissu hétérogène par nature. Cette hétérogénéité résulte de la grande diversité des fibres musculaires qui le composent. Jusqu'aux années 1968-1970 environ, la conception commune de la diversité des muscles chez les mammifères était basée sur la vieille classification des muscles rapides d'un côté, et des muscles lents de l'autre. Les muscles rapides, caractérisés par un métabolisme glycolytique et spécialisés dans l'activité phasique étaient généralement identifiés par des muscles blancs alors que les muscles lents, riches en myoglobine et en enzymes oxydatives et spécialisées dans l'activité continue étaient appelés muscles rouges. Les approches mécaniques et biochimiques ont trouvé leur point de rencontre dans la relation entre l'activité ATPasique de la myosine activée par l'actine et la vitesse de raccourcissement du muscle au sein des différents muscles et des différentes espèces (Bárány, 1967). De manière générale, il existe donc deux types de fibres : les fibres lentes (de type 1) et les fibres rapides (de type 2). Les fibres de types 2 sont elles-mêmes classées selon trois sous-types : 2A, 2X (ou 2D) et 2B. Leur vitesse de contraction varie selon la relation suivante : $1 < 2A < 2X < 2B$ (Jaweed, Herbison, & Ditunno, 1977). Alors que les fibres rapides interviennent dans les mouvements rapides et les hauts niveaux de forces, les fibres lentes sont utilisées lors des contractions prolongées. Ainsi, il est communément admis qu'une grande partie des

propriétés contractiles telle que la vitesse de raccourcissement ou la force développée, repose sur la composition isoforme de chaînes lourdes de myosine (MHC) qui constituent les fibres musculaires (Bottinelli *et al.*, 1996, 1999).

La composition en isoforme de MHC d'un muscle, appelée phénotype, présente une grande capacité adaptative en réponses à des changements d'activité nerveuse, de charge (activité physique) ou de facteurs circulants (hormones). En effet, un muscle lent deviendra plus rapide après une réinnervation par un nerf rapide, et inversement. Un muscle deviendra plus lent après réinnervation par un nerf lent. Ces méthodes de cross-innervation ont été montrées pour la première fois chez le chat en 1960 (Buller, Eccles, & Eccles, 1960) puis chez le rongeur en 1975 (Hoh, 1975). Ainsi, un shift de lent vers rapide dans la direction MHC1 → MHC2A → MHC2X → MHC2B est induit par une électrostimulation phasique à haute fréquence (simulant le patron d'activité d'un motoneurone rapide) ou une hypoactivité (suspension). De la même manière, un shift vers un phénotype lent dans le sens MHC2X → MHC2A → MHC1 sera induit par une électrostimulation tonic à basse fréquence (simulant l'activité électrique d'un motoneurone lent) ou une surcharge (par ablation des synergistes par exemple) (Pette & Vrbová, 1999; Kamei *et al.*, 2004). La capacité adaptative dépend de la composition initiale d'un muscle donné mais est également muscle spécifique. Ainsi, l'expression de MHC2A sera augmentée dans le soléaire mais diminuée dans le tibialis antérieur (TA) et (EDL) après une électrostimulation lente et phasique par exemple (Ausoni *et al.*, 1990). La régulation génique responsable de changements phénotypiques est sous la dépendance de 3 grands mécanismes adaptatifs : (1) les facteurs de transcription comme le facteur nucléaire pour les lymphocytes-T activés dépendant de la calcineurine (NFAT), (2) les promoteurs bidirectionnels et (3), les micro-ARNs (miARNs), petits ARNs non codant présents dans les gènes codant pour les MHC. Se référer à l'étude de Schiaffino et Reggiani et aux références citées pour une revue complète sur les différentes isoformes de fibres et leurs propriétés (Schiaffino & Reggiani, 2011)

Au sein du muscle squelettique, NFAT possède un rôle à la fois activateur sur le gène *Myh7*, codant pour les MHC1 et répresseur sur les gènes *Myh1* et *Myh4* codant pour les MHC2X et MHC2B respectivement (McCullagh *et al.*, 2004) (**Figure 22A**). NFAT, régulé par la calcineurine, n'est pas le seul facteur de transcription régulant les programmes géniques. Certains promoteurs bidirectionnels, définis comme des régions régulatrices pouvant potentiellement moduler l'expression de deux gènes contigus, sont situés proches de familles de gènes appelées cluster, et possèdent une action sur ces gènes par l'intermédiaire de la production transcrits sens et anti-sens. Baldwin et collaborateurs ont mis en évidence un

promoteur bidirectionnel régulant l'expression des gènes *myh1* et *myh4* codant pour les isoformes MHC2A et MHC2X (Rinaldi *et al.*, 2008). Ils ont montré que 4 jours d'exercice en résistance chez le rongeur induisait la présence d'ARN sens et anti-sens dans la région intergénique entre *myh1* et *myh4* et que l'expression de ces ARN était corrélée à l'expression des pré-ARN de ces gènes (**figure 22B**). Ces résultats montrent que le shift phénotypique des MHC2B vers les MHC2X est sous la dépendance d'un promoteur bidirectionnel intergénique. Le troisième mécanisme impliqué dans la plasticité du phénotype musculaire implique les mi-ARNs coexprimés au sein des *MYH*. MiR-208b et miR-499 présents dans les introns des gènes *myh7* et *myh7b* (appelé également *myh14*) codant pour les MHC1, vont réguler négativement *myh1* (van Rooij *et al.*, 2009). De fait, ces mi-ARNs vont favoriser un phénotype oxydatif en activant le programme génique des fibres lentes et bloquant le programme génique des fibres rapides (**figure 22C**). Ils font l'objet d'une revue récente de la littérature publiée par Kirby et McCarthy (Kirby & McCarthy, 2013).



L'entraînement en résistance détermine l'expression un d'phénotype musculaire intermédiaire

En plus d'une hypertrophie, il est maintenant bien établi que l'entraînement détermine également des changements de typologie au sein des muscles sollicités. Le shift phénotypique observé suite à un entraînement en résistance est caractérisé par une diminution de l'isoforme MHCIIB et une augmentation de l'isoforme MHCIIA chez le petit mammifère (De Souza *et al.*, 2011; Begue *et al.*, 2013). Chez l'Humain, des études portant sur le *vastus lateralis* (la plus grosse partie du muscle quadriceps fémoral) indiquent que la diminution de l'isoforme MHCIIIX est associée à une augmentation en MHCIIA (Adams *et*

al., 1993; Andersen, Klitgaard, & Saltin, 1994; Carroll *et al.*, 1998; Malisoux *et al.*, 2006). Chez les culturistes s'entraînant en résistance à haute intensité, une augmentation des MHCIIX est concomitante à une diminution en MHC1 (D'Antona *et al.*, 2006). Par ailleurs, les changements phénotypiques liés à l'entraînement en résistance semblent affectés par l'intensité de l'exercice ou encore par le temps de repos entre chaque série. En effet, il a été montré qu'un entraînement en résistance réalisé à faible intensité (15% de la répétition maximale) était insuffisant pour induire un shift même si une discrète mais néanmoins significative hypertrophie était observée dans la *vastus lateralis* chez l'Humain (Holm *et al.*, 2008). De Souza et collaborateurs ont montré qu'un entraînement réalisé à haute intensité avec un temps de repos insuffisant entre chaque série induisait une atrophie mais aussi les mêmes adaptations phénotypiques que celles observées lors d'un entraînement en résistance classique, avec une diminution des MHCIIA et une augmentation des MHCIIB dans le muscle *plantaris* chez le rat (De Souza *et al.*, 2011). L'expression des ARN messagers des isoformes I, IIA et IIX est augmentée de 38% à 72% dès 6 h après une unique session d'exercice réalisé à 75-80% de la charge maximale, indiquant la rapidité avec laquelle le programme de changements phénotypiques se met en place (Willoughby & Nelson, 2002). D'autres facteurs, en plus de l'entraînement peuvent moduler les adaptations phénotypiques. La supplémentation en créatine par exemple, semble favoriser le maintien d'un phénotype oxydatif lors de l'entraînement en résistance en bloquant le shift des MHC1 vers les MHC2 chez le rat (Aguiar *et al.*, 2010). De plus, sans entraînement, la même étude montre même une augmentation des MHC1 au détriment des MHC2. Non seulement la créatine limite le shift glycolytique en réponse à l'entraînement mais favorise également le phénotype oxydatif chez l'animal sédentaire.

De manière générale, l'entraînement en résistance favorise l'apparition d'un phénotype intermédiaire caractérisé par une augmentation de l'expression des isoformes MHC2A et une diminution de l'expression des isoformes MHC2B ou MHC2X. Ces variations sont parfois, mais pas systématiquement, accompagnées par une diminution de l'expression des fibres oxydatives (Adams *et al.*, 1993; Haddad *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2003).

Techniques d'évaluation du phénotype

Classiquement, la composition en isoforme de MHC est évaluée par migration des chaînes lourdes sur gel (électrophorèse sur gel de polyacrylamide). Les MHC migrent sous l'effet du courant électrique et se séparent selon leur taille. Cependant, il existe une forte corrélation

entre l'expression des différentes isoformes de fibre et l'expression des ARN messagers. La quantification de ces messagers rend alors possible la quantification phénotypique par RT-qPCR (Zurmanová & Soukup, 2013; Ellefsen *et al.*, 2014), méthode employée lors de mes travaux de recherche (étude 3).

2.2.2. Adaptations qualitatives, à l'échelle de la myofibrille

La vitesse de contraction du muscle est une caractéristique fondamentale et déterminante dans la production de force. La relation force-vitesse est de forme hyperbolique et la vitesse est inversement liée à la force de contraction (**figure 23**). Le muscle peut donc développer de hauts niveaux de force à de faibles vitesses ou inversement, une vitesse de contraction élevée à de faibles niveaux de force (Hill, 1938).



Figure 23 : Relation entre la charge et la vitesse de contraction lors d'une contraction isotonique. La charge est exprimée en gramme car à l'époque un système de poulie et de poids suspendu permettait d'imposer une charge et de mesurer la vitesse de raccourcissement. L'augmentation de la charge imposée au muscle (et donc de sa force de contraction) induit une diminution de sa vitesse de raccourcissement. La figure est tirée de Hill, 1936.

Les constantes de vitesses et la force générée doivent donc être déterminées. La partie suivante définit ces notions de force et de vitesse de raccourcissement et propose un état des connaissances au sujet des effets de l'entraînement en résistance sur ces 2 caractéristiques

contractiles fondamentales. Par ailleurs, d'autres mécanismes adaptatifs en réponse à l'entraînement en résistance semblent intervenir à l'échelle de l'unité contractile, au sein de l'interaction actine-myosine. Plus particulièrement, la puissance mécanique générée par le cycle mécano-chimique semble augmentée avec l'entraînement en résistance, à travers une augmentation de l'activité ATPasique. Cette réponse de l'activité ATPasique à l'entraînement a été plus détaillée lors de mes travaux de thèse (étude 3).

2.2.2.1. V_0 et V_f

Définitions

A charge nulle et en conditions d'activation maximale, les sarcomères se raccourcissent à vitesse maximale (V_0). V_0 , également appelée maximal shortening velocity ou unloading velocity en anglais, est déterminée par la technique de slack-test ou quick release (Edman, 1979). Brièvement, lorsque la fibre est en tension tétanique, ses deux extrémités sont rapprochées très rapidement, provoquant le relâchement de la fibre et faisant ainsi chuter brutalement la tension. Les longueurs des sarcomères pré- et post-relâchement (ΔL), ainsi que le temps nécessaire à la fibre pour recouvrer sa tension initiale (Δt) sont mesurés puis exprimés l'un en fonction de l'autre. La pente ainsi obtenue fournit V_0 (égale à $\Delta L / \Delta t$). Au moins trois amplitudes de relâchement étaient appliquées afin de s'assurer de la nature linéaire de la relation entre ΔL et Δt . V_0 dépend des isoformes de MHC de la fibre, de la température et varie chez l'Humain de $0,35 \text{ l.s}^{-1}$ (longueur de sarcomère par seconde) à $3,68 \text{ l.s}^{-1}$ pour les MHC1 et MHC2X respectivement à 15°C (Larsson & Moss, 1993). V_0 est environ 10 fois supérieure pour les MHC2X par rapport aux MHC1, avec entre les deux, les fibres intermédiaires MHC2A à cette température (Larsson & Moss, 1993; Widrick *et al.*, 1996a; Bottinelli *et al.*, 1996). La température possède un effet majeur sur V_0 . En effet, la valeur de Q10 (coefficient mesurant la vitesse de variation de V_0 à la suite d'une augmentation de la température de 10°C) atteint une valeur supérieure à 5 (Bottinelli *et al.*, 1996). Bottinelli et collaborateurs ont également rapporté des différences de V_0 au sein d'une même isoforme chez le petit mammifère (Bottinelli *et al.*, 1994a), et les ont expliquées par la variabilité d'expression des MLC. Ainsi, plus le contenu fibrillaire est riche en MLC3f (isoforme A2 de ELC), plus V_0 est élevée. Des variations ont aussi été observées pour une isoforme de MHC donnée selon le muscle observé (Widrick *et al.*, 1997). Cependant, ces variations sont nettement inférieures à celles liées aux isoformes de MHC. Selon Huxley, V_0 dépendrait de la vitesse de détachement actine-myosine après la

génération de force (Huxley, 1957). D'après Bárány, V_0 est liée l'activité ATPasique de la myosine (k_{cat}), expliquant la différence d'amplitude de V_0 et de k_{cat} entre le muscle squelettique et le muscle lisse (Bárány, 1967). La variabilité de V_0 est donc principalement, mais pas totalement expliquée par la composition en isoformes de MHC.

Bien que V_0 fournisse des informations sur la vitesse de raccourcissement des fibres, il est difficile d'isoler les effets des mécanismes d'interaction actine-myosine des mécanismes liés à la structure sarcomérique impliquant les protéines de régulations telles que la troponine, la tropomyosine ou la titine. Le développement de la technique d'IVMA (*in vitro* motility assay) a constitué une avancée fondamentale pour l'étude des propriétés mécano-chimiques des moteurs moléculaires (Sheetz & Spudich, 1983; Yanagida *et al.*, 1984; Kron & Spudich, 1986; Ishijima *et al.*, 1991; Finer, Mehta, & Spudich, 1995). Cette technique repose sur les mesures de vitesses de glissement de l'actine sur la myosine (V_f). Brièvement, les myosines issues de prélèvements musculaires sont purifiées, les filaments épais sont polymérisés *in vitro* puis fixés sur une plaque en verre. L'actine globulaire est polymérisée en actine filamentaire par ajout d'HEPES puis un marquage fluorescent est réalisé (phalloïdine-tetramethyl rhodamine isothiocyanate) (Elangovan *et al.*, 2012). Enfin, la myosine et l'actine purifiées sont mises en contact en situation d'activation saturée en MgATP. Les déplacements de l'actine sont suivis par microscopie optique à fluorescence. Cette méthode permet de s'affranchir de l'arrangement natif myofilamentaire tridimensionnel et de réduire la cinétique de raccourcissement V_f à la simple interaction actine-myosine, contrairement à V_0 . La charge mécanique imposée lors de la mesure de V_f étant négligeable et réduite aux simples mouvements Browniens (Howard, 2001), V_f devrait être comparable à V_0 , car les 2 sont limités par le détachement actine-myosine qui survient après le powerstroke (Huxley & Simmons, 1971). Cependant, les résultats d'Elangovan et collaborateurs indiquent que V_f est bien inférieure à V_0 (40-50%), probablement à cause de l'intervention de facteurs systématiques comme une orientation différente des têtes de myosine entre les deux conditions gênant l'interaction actine-myosine en IVMA et ralentissant V_f (Elangovan *et al.*, 2012). Leur comparaison de cinétiques leur a permis d'identifier la libération de l'ADP comme facteur limitant au détachement de l'actine sur la myosine à 5°C et à charge faible. Selon Nyitrai et collaborateurs, la libération de l'ADP ne serait limitante qu'à température physiologique (Nyitrai *et al.*, 2006). A 12°C, l'étape limitante du cycle mécano-chimique serait dépendante de l'isoforme de MHC. Elle concernerait l'étape de collision de l'ATP

pour les isoformes rapides de MHC2 et la libération de l'ADP pour les isoformes lentes de MHC2.

La vitesse de raccourcissement des fibres est principalement dépendante de la température et des isoformes de chaîne lourde et légère de myosine. Mais existe-t-il un effet de l'entraînement sur ces cinétiques, et ce, indépendamment du phénotype ?

Effets de l'entraînement sur V_0 et V_f

Les effets de l'entraînement sur V_0 sont encore aujourd'hui assez mal définis. De nombreuses études ont examiné V_0 mais il existe une grande disparité dans les observations qui ne peut être que partiellement comprise en démêlant les effets liés à des facteurs confondants. A l'issue d'un entraînement en endurance, une diminution de V_0 a été repérée pour les fibres de type 1 uniquement (Harber *et al.*, 2004), et est certainement liée à une modification des MLC qui peuvent moduler V_0 indépendamment de changements en MHC (Bottinelli *et al.*, 1996). En résistance, contrairement à l'étude de Widrick et collaborateurs qui n'identifie aucun changement de V_0 pour les fibres de type 1 et 2A après 12 semaines d'entraînement (Widrick *et al.*, 2002), une augmentation de V_0 a été observée au sein de ces mêmes fibres après une période d'affûtage chez des nageurs élités (Trappe, Costill, & Thomas, 2000b). Ces différences de résultats peuvent être liées à la durée de l'entraînement ainsi qu'à la présence d'une période d'affûtage. Deux études portant sur les effets de l'entraînement à long terme (1 an) chez la jeune femme (Pansarasa *et al.*, 2009) et la femme âgée (Parente *et al.*, 2008) ont montré une augmentation de V_0 pour les fibres de type 1 et 2A qui semble indiquer que la répétition des stimuli sur une longue période est importante dans la détermination de ce type d'adaptations musculaires. Cependant, une autre étude n'a identifié aucune variation de V_0 après 1 an d'entraînement en résistance à charge élevée (67-100% de la RM) (Shoepe *et al.*, 2003). Les travaux de Trappe et collaborateurs ont montré une dépendance de V_0 vis à vis du genre et de l'âge. V_0 était augmenté après entraînement en résistance progressif de 12 semaines pour les fibres de type 1 et 2A chez les hommes âgés (72 ± 2 ans) (Trappe *et al.*, 2000a) mais pas chez les femmes âgées (Trappe *et al.*, 2001). De plus, chez des séniors (> 82 ans), V_0 était augmenté uniquement pour les fibres 2A (Trappe, Williamson, & Godard, 2002). Dans un contexte totalement opposé, une suspension par les pattes arrière chez la souris était associée à une diminution de V_0 pour les fibres de type 2B, probablement à cause de la présence de phosphorylations des MLC qui viendraient ralentir les cinétiques d'interaction actine-myosine (Maffei *et al.*, 2014).

Cette variabilité d'observations rend complexe l'analyse de la réponse de V_0 à l'entraînement. Cependant, les nombreuses données expérimentales citées ci-dessus montrent globalement des adaptations de V_0 à l'entraînement en résistance. De manière intéressante, une augmentation de V_f au sein des fibres de type 2A a été observée après 12 semaines d'entraînement en résistance chez l'Humain (Canepari *et al.*, 2005). V_f étant uniquement liée à l'interaction actine-myosine, ces résultats suggèrent de façon intéressante que l'entraînement peut moduler les fonctions musculaires au niveau moléculaire de l'interaction actine-myosine.

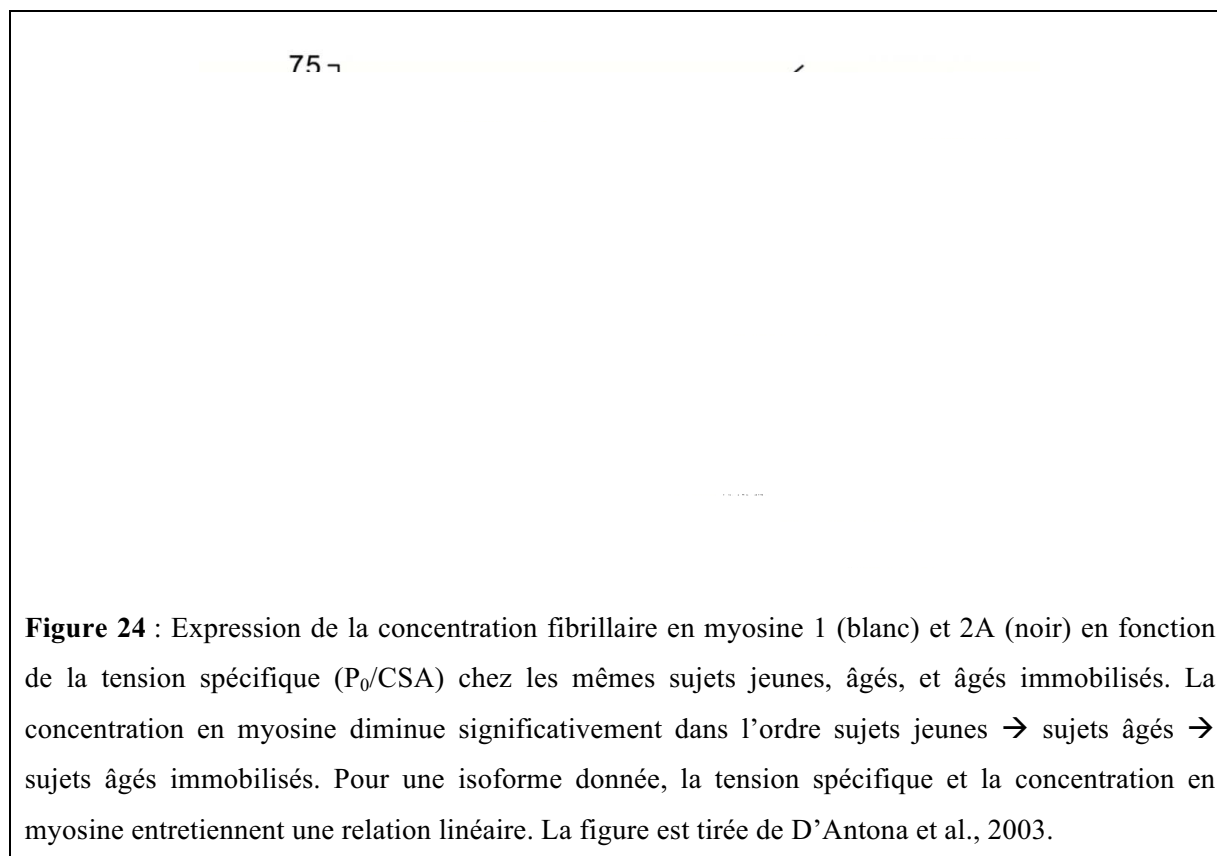
2.2.2.2. P_0/CSA

Définition

La tension spécifique (P_0/CSA) est déterminée à partir de la mesure de la force isométrique (P_0) et de la CSA. Elle représente donc la force développée par un muscle ou une fibre isolée normalisée par la surface de section. Chez l'Humain, les mesures de P_0/CSA sur fibres montrent une grande variabilité entre les fibres les plus faibles et les plus fortes. Par exemple, la valeur de P_0/CSA peut aller de 44 kN.m^{-2} (Bottinelli *et al.*, 1996) à 261 kN.m^{-2} (Fink, Stephenson, & Williams, 1990) pour les fibres de type 1 et de 61 N.m^{-2} à 365 kN.m^{-2} pour les fibres de type 2A (mêmes sources). Cette variabilité peut être liée aux différences de conditions expérimentales comme la température ou l'âge des sujets, qui varie dans ces deux études de 5-8 ans à 30-50 ans. Cette variabilité n'est donc pas uniquement dépendante des isoformes en MHC. Certaines études ont montré que P_0/CSA était inférieure pour les MHC1 par rapport aux MHC2A et MHC2X (Widrick *et al.*, 1996a; Bottinelli *et al.*, 1996) alors d'autres études ne montrent pas de dépendance vis à vis des isoformes (Larsson & Moss, 1993). Par ailleurs, au sein des seules fibres rapides, il n'existe pas non plus de consensus net. Certaines études n'ont pas observé de différences de P_0/CSA entre les différentes fibres rapides (Larsson & Moss, 1993; Bottinelli *et al.*, 1996; D'Antona *et al.*, 2006) mais d'autres si (Widrick *et al.*, 1996b). La composition en isoforme de MHC ne suffit pas pour expliquer la variabilité observée. Cette variabilité est certainement due, du moins en partie, aux différentes approches expérimentales employées dans les études, que ce soit dans le choix de préparations des fibres (fraîches ou congelées), la méthode de calcul de la CSA ou encore les conditions expérimentales (force ionique des solutions, pH,

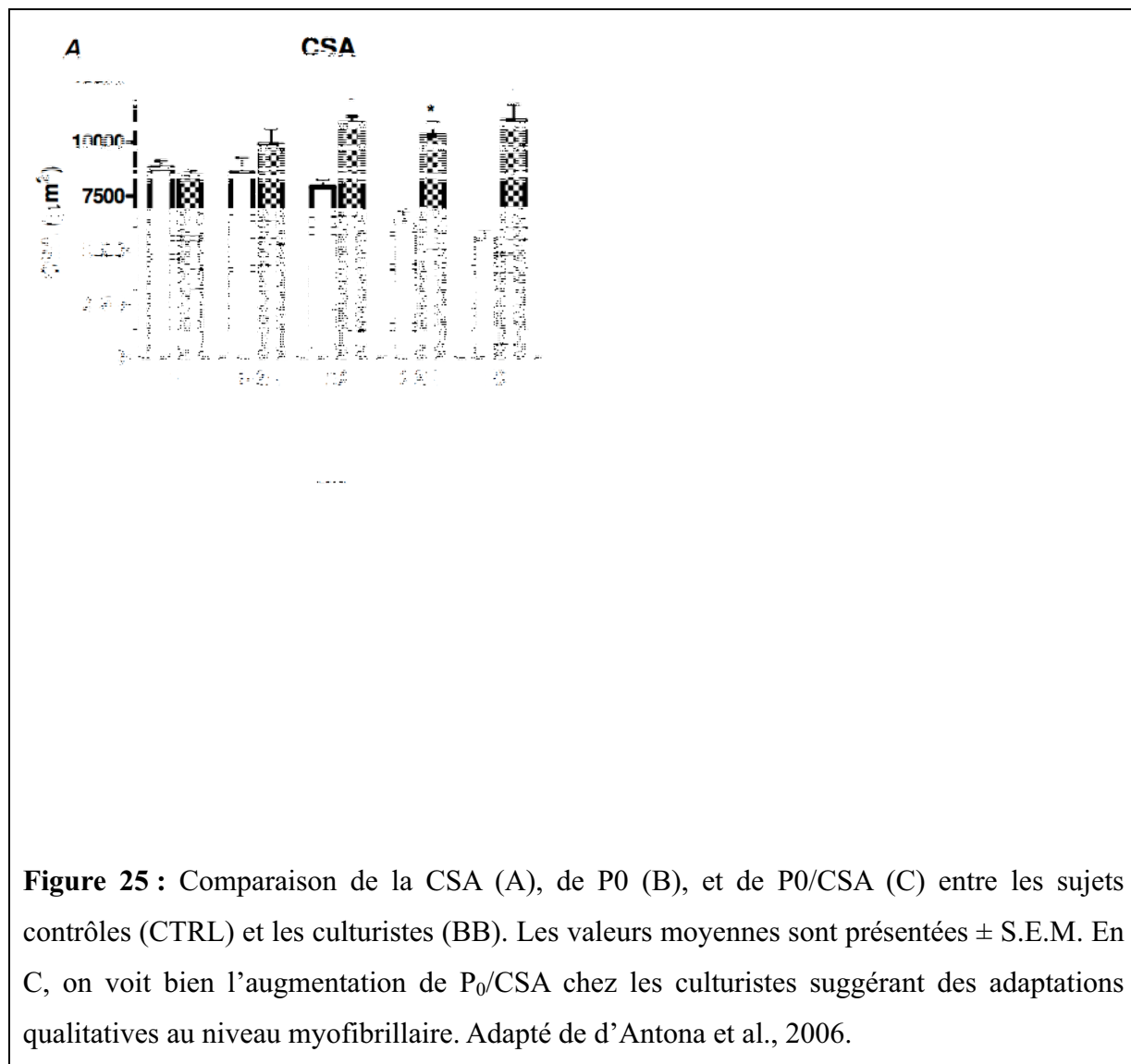
concentration en P_i et surtout température). En effet, P_0 est très sensible aux variations de températures comprises entre 0 et 22° et décroît linéairement avec la concentration en P_i (Pate, Franks-Skiba, & Cooke, 1998).

Au-delà de la variabilité de mesure de P_0/CSA liée aux approches expérimentales, P_0/CSA représente une véritable capacité adaptative du muscle en réponse à certains stimuli. Une des premières preuves que les fibres musculaires pouvaient changer leurs propriétés contractiles sans changement dans leur contenu en isoforme de myosine vient des travaux de Larsson sur les fibres musculaires de personnes âgées. Il a montré une diminution de P_0/CSA et V_0 comparé aux sujets jeunes au sein des fibres de type 1 et 2A seulement (Larsson, Li, & Frontera, 1997). D'Antona et collaborateurs ont fourni une explication tout à fait plausible sur la base de la relation linéaire qui existe entre P_0/CSA et la concentration myofibrillaire (D'Antona *et al.*, 2003). Cette dernière expliquerait au moins dans le cas présent les variations de force spécifique. Ainsi, la perte en contenu protéique (diminution de la concentration en myosine) liée à l'âge est un déterminant majeur de la chute de la tension spécifique (**figure 24**). Cette altération quantitative (diminution du nombre de myofibrille par fibre) intervenant au cours du vieillissement a été aussi mise en évidence lors d'un traitement au long cours à base de glucocorticoïdes (Minetto *et al.*, 2015).



La tension spécifique augmente sous l'effet de l'entraînement

Il ne semble pas vraiment exister de consensus quant à l'effet de l'entraînement sur P_0/CSA . Plusieurs travaux expliquent les gains de force par l'augmentation proportionnelle de la CSA après 12 semaines d'entraînement en résistance (Widrick *et al.*, 2002; Shoepe *et al.*, 2003). Les gains observés seraient donc de nature essentiellement quantitative car le rapport P_0/CSA reste inchangé. Cependant, des études plus récentes montrent une augmentation possible de P_0/CSA sous l'effet l'entraînement. En effet, en endurance, chez les coureurs de fond, P_0/CSA est diminuée dans les MHC1 après une phase d'affûtage de 4 semaines faisant suite à une phase de surentraînement de 8 semaines (Harber *et al.*, 2004). Chez les culturistes entraînés en résistance à haute intensité pendant au moins 2 ans, de larges hypertrophies des fibres 2A, 2AX et 2X ont été observées avec une augmentation concomitante de P_0 dans ces mêmes fibres et une diminution de P_0 dans les fibres de type 1 comparé aux contrôles (**figure 25A, B**) (D'Antona *et al.*, 2006). P_0/CSA est augmenté dans les fibres de type 2A, 2AX et 2X et diminué dans les fibres de type 1 en réponse à l'entraînement (**figure 25C**). Il semblerait donc que les variations de tension spécifique à l'entraînement en résistance aient dans des sens opposés selon les fibres rapides et lentes. Cette diminution de P_0/CSA observée au sein des fibres de type 1 est difficile à expliquer dans la mesure où ces fibres ne présentent pas d'atrophie ne sont sûrement pas moins sollicitées que les fibres de type 1 chez le groupe sédentaire contrôle.



L'entraînement en résistance sur une longue période et à charge modérée (*i.e.* 60% de la répétition maximale) peut aussi induire une augmentation de la tension spécifique sans hypertrophie. Après 1 an d'entraînement, des gains significatifs de P_0/CSA ont été repérés pour les fibres 1, et 2A chez des jeunes femmes (25 ± 2 ans) (Pansarasa *et al.*, 2009) et chez la femme âgée (78 ± 4 ans) (Parente *et al.*, 2008) pouvant expliquer, du moins en partie, les gains de force développée lors du test de répétition maximale à la fin du programme d'entraînement. Par comparaison avec les études ci-dessus réalisées sur fibres isolées, des résultats similaires ont été obtenus sur muscle entier. Eskine et collaborateurs ont observé une augmentation de la CSA physiologique de 6% sur le quadriceps fémoral et une augmentation de force maximale de contraction de plus de 31% suite à un entraînement en résistance progressif (9 semaines, avec des charges allant de 40% à 80% de la répétition

maximale en fin de programme) (Erskine *et al.*, 2010). Ces résultats montrent une augmentation de P_0/CSA d'environ 20% par rapport aux contrôles. Cette augmentation peut être liée à des changements phénotypiques au sein du muscle étudié, à une augmentation de la tension spécifique de chaque fibre liée à une plus grande densité de myofilaments (Parente *et al.*, 2008; Pansarasa *et al.*, 2009, p. 2) ou encore à des changements de propriétés d'attachement entre les protéines contractiles et les tissus connectifs menant à une meilleure transmission de force du muscle aux tendons et aux pièces osseuses. Dans un contexte opposé, un déconditionnement par suspension unilatérale du membre inférieur de 3 semaines induit diminution de la force et de la concentration en myosine du quadriceps fémoral qui semble expliquée, du moins en partie, par l'atrophie musculaire (Campbell *et al.*, 2013).

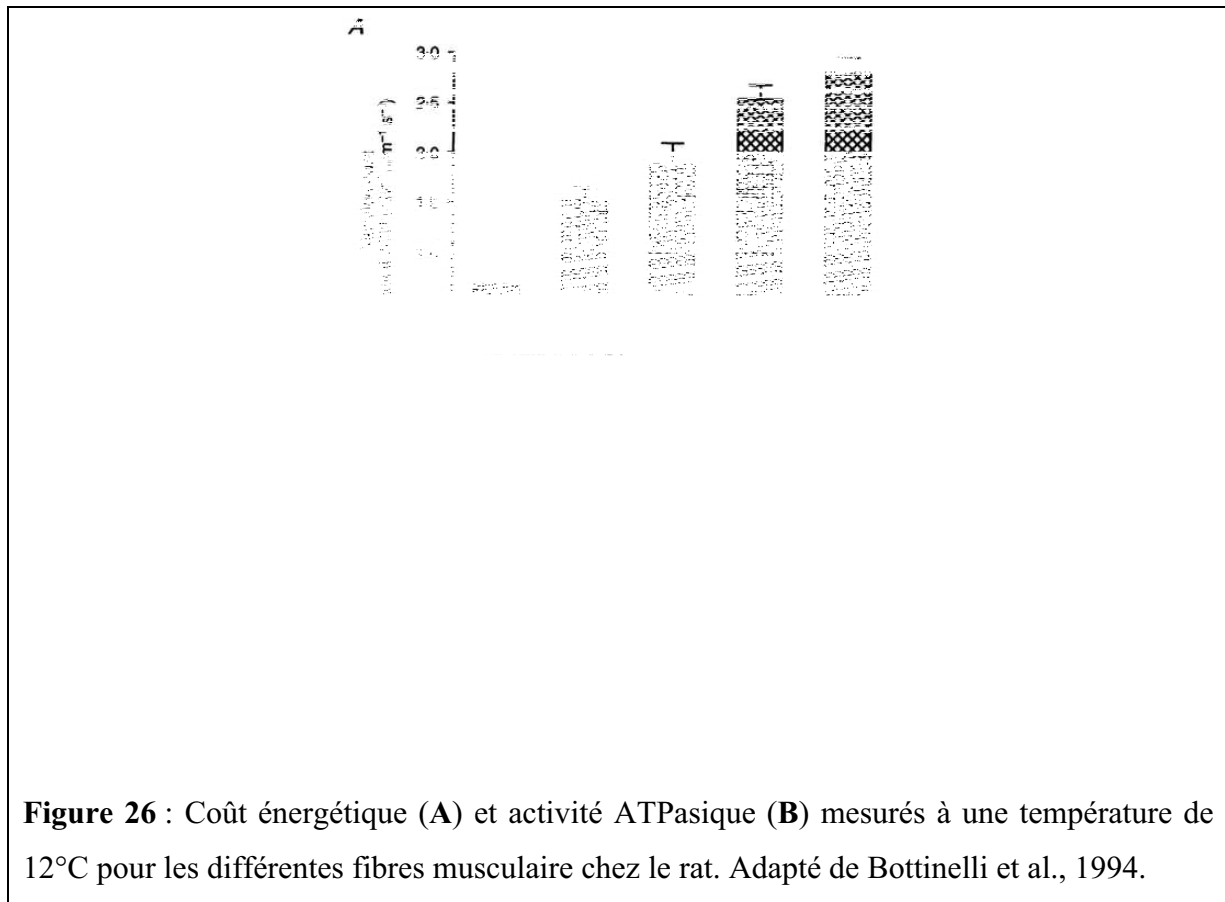
Collectivement, ces résultats semblent indiquer que des mécanismes adaptatifs encore méconnus seraient responsables de l'augmentation de force spécifique à l'entraînement en résistance. Des adaptations plus fines, localisées au niveau du sarcomère et plus particulièrement au sein de l'interaction actine-myosine, seraient susceptibles d'expliquer ces larges gains de tension spécifique observés à l'entraînement en résistance.

2.2.2.3. Adaptations de l'activité ATPasique de la myosine

Définitions

Parmi les facteurs responsables de l'hétérogénéité des propriétés contractiles et physiologiques de la fibre musculaire, l'activité ATPasique de la myosine présente un intérêt majeur. Cette activité enzymatique est à la base de la conversion de l'énergie chimique, issue de l'hydrolyse de l'ATP en ADP et P_i , en énergie mécanique, elle-même à l'origine de la production de force et mouvement. Les différences d'activité ATPasique entre la variété des fibres musculaires ont fait l'objet de nombreuses études depuis qu'elles sont classifiées selon leur différente sensibilité au pH (Engel, 1998). Selon la théorie classique, l'activité ATPasique serait déterminée par les isoformes de MHC, et cela de façon invariable (Bottinelli *et al.*, 1994b). Les fibres lentes possèdent une activité ATPasique la plus faible, les 2B la plus élevée, et les fibres 2A, 2X et mixtes étant intermédiaires à températures faibles et non-physiologiques (**figure 26B**). Ces variations inter-isoformes s'étendent jusqu'au coût de la contraction, déterminé par le ratio entre activité ATPasique et P_0/CSA

(tension cost), qui varie au sein des fibres selon la relation suivante $1 < 2A$ et $2X < \text{mixes} < 2B$ (**figure 26A**). Plus la fibre est rapide, plus son tension cost est élevé.



De façon intéressante, lorsque la température se rapproche de celle physiologique, la différence d'activité ATPasique entre les myofibrilles de psoas (isoformes rapides 2B et 2X essentiellement) et de soléaire (isoformes lentes 1 et 2A essentiellement) de lapin s'atténue jusqu'à disparaître à 39°C (Candau *et al.*, 2003) (**figure 27**). L'activité ATPasique de ces deux muscles rapide et lent est donc similaire à température physiologique, que ce soit en condition d'activation (présence de calcium) ou en condition relaxe (en absence de calcium).

3.2 3.3 3.4 3.5 3.6

Figure 27 : Effets de la température sur l'activité ATPasique en condition activée par le calcium (en haut) en en condition relaxe sans calcium (en bas). Le logarithme de l'activité ATPasique (k_{ss}^{\max} et k_F max pour les conditions activés et relaxe, respectivement) est exprimé en fonction de $1/\text{température}$. A 39°C (ligne verticale en pointillés) et pour les deux conditions, l'activité ATPasique est similaire pour les deux muscles. La figure est tirée de Candau et al., 2003.

Certaines évidences expérimentales issues d'études réalisées en endurance semblent indiquer qu'au-delà des changements phénotypiques, l'activité ATPasique pourrait varier, pour une isoforme de fibre donnée, dans des conditions spécifiques.

Réponse à l'entraînement en endurance

Très peu d'études se sont intéressées aux adaptations de l'activité ATPasique à l'entraînement. Schluter et Fitts sont les premiers à avoir émis l'hypothèse que l'activité ATPasique pouvait varier, pour une isoforme de fibre donnée, après un entraînement en

endurance (Schluter & Fitts, 1994). L'entraînement en endurance consistait en des courses sur tapis roulant, 5 jours par semaines pendant 8 à 12 semaines. La vitesse initiale était fixée à 22 m.s^{-1} en début de programme et était progressivement augmentée pour atteindre 31 m.s^{-1} à la fin du programme. Les auteurs ont montré chez le rat que l'activité ATPasique était bien corrélée à V_0 pour les fibres 1, 2A et 2B, que cette relation était linéaire et que ces cinétiques étaient spécifiques pour chacune de ces isoformes. Toujours dans cette même étude, l'entraînement en endurance a déterminé une augmentation de 23% de l'activité ATPasique et de V_0 pour les fibres lentes du soléaire comparé au groupe contrôle non entraînés (Schluter & Fitts, 1994). Ces résultats soutiennent la théorie selon laquelle que V_0 serait limitée par l'activité ATPasique (Bárány, 1967). Une autre étude, plus récente, a mesuré l'effet de l'entraînement en endurance et de l'hypoxie sur l'activité ATPasique (Roels *et al.*, 2008). Une augmentation de l'activité ATPasique par tête de myosine de 24% a été observée chez les rats entraînés en endurance pendant 5 semaines à 80% de vitesse maximale aérobie comparé aux contrôles. Par ailleurs la titration, c'est à dire la proportion des têtes de myosine pleinement compétentes d'un point de vue enzymatique, ne semblait pas modifiée avec l'entraînement. Au sein des fibres de type 1, l'état de phosphorylation des MLC-2, connues pour être impliquées dans vitesse de contraction et la production de force (Sweeney & Stull, 1990), restait inchangé entre les conditions contrôle et entraînée. La fraction de tête de myosine réellement active et les MLC ne pouvant pas expliquer des gains d'activité ATPasique par tête de myosine, ces résultats suggèrent bien une adaptation de l'activité ATPasique elle-même.

Objectifs

Les modèles d'étude de la contraction musculaire présentent des degrés d'organisation bien distincts les uns des autres. A l'échelle moléculaire, les études sur systèmes isolés ont permis d'identifier les mécanismes structuraux et les interactions électrostatiques qui régulent la chorégraphie du couple actine-myosine. L'ATP, carburant du cycle mécano-chimique, est au cœur de nos préoccupations. Son hydrolyse par le site catalytique de la tête de myosine libère une énergie de 50 kJ par mole (Kushmerick, Larson, & Davies, 1969). La conversion de cette énergie chimique en énergie mécanique à l'origine du mouvement est opérée avec un rendement de 40% à 20°C (He *et al.*, 2000) et certainement proche de 50% à température physiologique. A l'étage cellulaire de la fibre musculaire elle-même ainsi qu'à l'étage subcellulaire de la myofibrille, toute la complexité et la richesse de la machinerie contractile et d'activation par le calcium sont présentes. Les problèmes de diffusion des nucléotides et du calcium qui peuvent limiter les expérimentations sur les fibres pelées ne se posent pas pour les myofibrilles en raison de leur diamètre réduit de l'ordre du micron. Aussi lors de mes travaux de thèse, j'ai retenu le modèle des myofibrilles pour comprendre les mécanismes adaptatifs du muscle en réponse à l'entraînement. En résistance, les muscles sollicités massivement présentent des adaptations à la fois quantitatives (gains de masse et de volume, changement en proportion des isoformes de chaînes lourdes de myosines) et qualitatives (augmentation de la vitesse de glissement de l'actine sur la myosine, de la tension spécifique). Cependant, les amplitudes de ces processus adaptatifs semblent parfois modestes comparé aux gains de puissances mesurés chez les athlètes. En effet, des observations simples n'ont pas encore reçu d'explication satisfaisante. Par exemple, les grimpeurs entraînés sont capables de gravir des falaises de plusieurs centaines de mètres de haut, à la simple force de leurs bras. Ils peuvent se hisser du bout des doigts alors qu'ils présentent une hypertrophie très limitée. Comment expliquer les forces de contraction nécessairement extraordinaires alors que les muscles restent au demeurant relativement fins ? Cette observation est d'autant plus intrigante qu'il existe en principe une relation de proportionnalité entre la surface de section des fibres musculaires et la force développée (Ikai & Fukunaga, 1968). L'absence d'hypertrophie proportionnelle au gain de force chez les grimpeurs suppose des adaptations présentes directement au sein des moteurs moléculaires eux-mêmes, les variations du phénotype décrites dans cette activité ne pouvant pas fournir d'explication vraiment satisfaisante dans la mesure où la force de contraction est

quasiment indépendante des changements d'isoforme de MHC. Il est alors possible de formuler l'hypothèse de l'existence d'une plasticité indépendante des adaptations phénotypiques qui s'exprimerait au sein de la myosine ATPase et qui se traduirait par une augmentation de l'activité ATPasique.

ETUDES REALISEES AU

COURS DE LA THESE

Ideas are cheap but good data are hard to come by

Andrew Szent-Gyorgyi

1924 - 2015

Etude 1 : Quantification de la charge d'entraînement et de la performance au judo

Article 1

Perceived training intensity and performance changes quantification in judo.

J Strength Cond Res. 2015 Jun; 29(6):1570-7.

Agostinho MF, **Philippe AG**, Marcolino GS, Pereira ER, Busso T, Candau R et Franchini E.

Introduction

Appliquée à l'entraînement sportif, la théorie des systèmes peut fournir une aide précieuse pour l'optimisation de la performance et en particulier dans l'aide à la détermination de stratégies individuelles d'entraînement. Comme évoqué précédemment, cette optimisation nécessite une quantification précise, par des mesures régulières de la charge d'entraînement et de la performance (Banister *et al.*, 1975). Dans le cas du judo, cette quantification des charges et de la performance est délicate. Le judo est une activité physique complexe qui, à l'instar des autres sports de combats et de la gymnastique, nécessite à la fois un haut degré de maîtrise technique et tactique ainsi qu'un renforcement musculaire approprié (Franchini *et al.*, 2008, 2011; Sanchez *et al.*, 2013). Par opposition aux activités d'endurance comme la course, la natation ou le cyclisme, le judo est une activité intermittente. Un combat se déroule sur 3 à 5 minutes avec une alternance de périodes d'effort et de repos relatif. De fait, le système cardiovasculaire n'atteint pas d'état stable et les mesures de rythme cardiaque utilisées pour quantifier l'entraînement selon la méthode des TRIMPS de Banister (Banister & Hamilton, 1985; Morton *et al.*, 1990) ne peuvent pas être employées aisément pour cette activité. De plus, les jeunes judokas ne participent à suffisamment de compétitions chaque année pour que l'on puisse utiliser leurs résultats en compétition comme critère de performance, résultat qui dépend également du niveau de l'opposant, rendant la quantification de la performance encore plus délicate.

Dans ce contexte, il n'existe à notre connaissance aucune méthode de quantifications des charges et de la performance pour les judokas. L'objectif de cette étude a été de proposer des critères d'évaluation de la charge d'entraînement et de la performance à travers l'application de la théorie des systèmes. Ainsi, nous avons testé différentes méthodes de quantification de ces charges et performance (à l'entraînement et en compétition), et appliqué différents modèles à complexité croissante chez 8 judokas brésiliens de niveau régional suivis pendant deux ans.

PERCEIVED TRAINING INTENSITY AND PERFORMANCE CHANGES QUANTIFICATION IN JUDO

MARCUS F. AGOSTINHO,^{1,2} ANTONY G. PHILIPPE,³ GILVAN S. MARCOLINO,² EWERTON R. PEREIRA,² THIERRY BUSO,⁴ ROBIN B. CANDAU,³ AND EMERSON FRANCHINI^{1,3}

¹Martial Arts and Combat Sports Research Group, School of Physical Education and Sport, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ²Barueri Recreation Association and Cotia Sports Secretary, Brazil; ³Faculty of Sports Sciences, UMR 866, University of Montpellier, Montpellier, France; and ⁴Laboratory of Physiology and Exercise, University of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

ABSTRACT

Agostinho, MF, Philippe, AG, Marcolino, GS, Pereira, ER, Busso, T, Candau, RB, and Franchini, E. Perceived training intensity and performance changes quantification in judo. *J Strength Cond Res* 29(6): 1570–1577, 2015—The objective of this study was to determine the methods of quantification for training and performance, which would be the most appropriate for modeling the responses to long-term training in cadet and junior judo athletes. For this, 10 young male judo athletes (15.9 ± 1.3 years, 64.9 ± 10.3 kg, and 170.8 ± 5.4 cm) competing at a regional/state level volunteered to take part in this study. Data were collected during a 2-year training period (i.e., 702 days) from January 2011 to December 2012. Their mean training volume was 6.52 ± 0.43 hours per week during the preparatory periods and 4.75 ± 0.49 hours per week during the competitive periods. They followed a training program prescribed by the same coach. The training load (TL) was quantified through the session rating of perceived exertion (RPE) and expressed in arbitrary unit (a.u.). Performance was quantified from 5 parameters and divided into 2 categories: performance in competition and performance in training. The evaluation of performance in competition was based on the number of points per level. Performance in training was assessed through 4 different tests. A physical test battery consisting of a standing long jump, 2 judo-specific tests that were the maximal number of dynamic chin-up holding the judogi, and the Special Judo Fitness Test was used. System modeling for describing training adaptations consisted of mathematically relating the TL of the training sessions (system input) to the change in performance (system output). The quality of the fit between TL and performance was similar, whether the TL was computed directly from RPE ($R^2 = 0.55 \pm 0.18$) or

from the session RPE ($R^2 = 0.56 \pm 0.18$) and was significant in 8 athletes over 10, excluding the standing jump from the computation of the TL, leading to a simplest method. Thus, this study represents a first attempt to model TL effects on judo-specific performance and has shown that the best relationships between amounts of training and changes in performance were obtained when training amounts were quantified simply from RPE.

KEY WORDS combat sports, training load, specific tests, season, rating of perceived exertion

INTRODUCTION

Competitive judo is a grappling combat sport in which opponents try to throw, immobilize, or submit (by choke or elbow joint-lock technique) each other to win the match, demanding a high technical and tactical development to reach success (18). Because the match is composed by high-intensity intermittent actions, with periods of effort near 30 seconds and pauses of approximately 10 seconds, until the end of the time limit (3–5 minutes depending on the age category), physical fitness also plays an important role in this sport (15). In general, adult judo athletes take part in 7–12 competitions per year (23), and this model has been introduced to cadet and junior judo athletes (24), with high-level competitions as Youth Olympic Games, World, Continental, and National Championships being part of the competitive season of young athletes. In high-level judo, hormonal (31) and biochemical control (25) are used to monitor the training responses. However, the resources—especially concerning physical testing—for young judo athletes are smaller than for adult judo athletes. Thus, affordable training monitoring procedures would help to increase the control of training prescription for these athletes, improving performance and avoiding problems related to overtraining, injury, and burnout.

Commonly, the use of rating of perceived exertion (RPE) scales to monitor training responses has gained popularity among coaches, trainers, and researchers (11). Among many scales available (11), the approach proposed by Foster et al.

Address correspondence to Emerson Franchini, emersonfranchini@hotmail.com.

29(6)/1570–1577

Journal of Strength and Conditioning Research
© 2015 National Strength and Conditioning Association

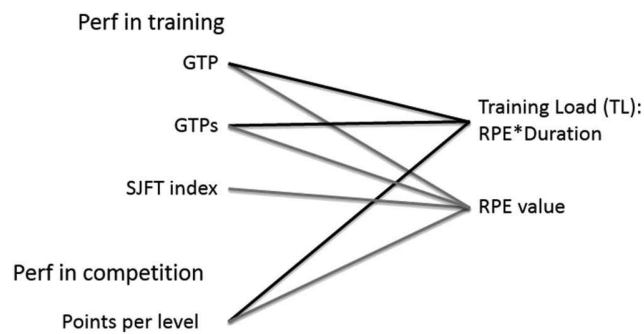


Figure 1. Tested correlations between performances and training loads. Black lines are the correlations between performances and training load. Gray lines are the correlations between performances and RPE value. GTP = global training performance; GTPs = simplified global training performance; SJFT index = Special Judo Fitness Test index; duration is expressed in minutes.

(12) is one of the most used one in combat sports (21,22,28–30,32,38,40). Furthermore, specific physical fitness tests are also recommended to monitor training responses, especially in complex sports where the measurement during the activity is difficult to conduct (2). The most simple and used specific physical tests to evaluate judo athletes are the Special Judo Fitness Test (SJFT) (14,15,35,36) and the dynamic chin-up holding the judogi (1,16). Both tests seem to discriminate judo athletes from different competitive levels (16,20) and to demand similar metabolic and fatigue profile as that observed during the competitive match (16,17,19), although long-term training monitoring using these tests is

lacking. Lower-body muscle power has also been reported as important to judo technique execution (43), with vertical jumping performance being a discriminant variable between judo athletes from different competitive levels (44).

One important approach to improve the understanding about training responses and prescription is to model the training process (9), allowing coaches to make better decision making about the stimulus needed to increase athletes' performance. This approach has been used in more controlled aerobic cyclical activities (42), sprint (37), and strength training (8). Sports involving a high technical component, such as artistic gymnastics, were only recently

TABLE 1. Individual coefficients of determination between actual and modeled performance.*†

	Athlete 1	Athlete 2	Athlete 3	Athlete 4	Athlete 5	Athlete 6	Athlete 7	Athlete 8	Athlete 9	Athlete 10	Mean ± SD
$R^2_{GTP/TL}$	0.79‡	0.75‡	0.70‡	0.66‡	0.57‡	0.51‡	0.48‡	0.37	0.35	0.30	0.55 ± 0.18
$R^2_{GTPs/TL}$	0.79‡	0.76‡	0.71‡	0.65‡	0.56‡	0.48‡	0.48‡	0.36	0.35	0.30	0.54 ± 0.18
$R^2_{GTP/RPE}$	0.80‡	0.79‡	0.70‡	0.67‡	0.58‡	0.48‡	0.47‡	0.42‡	0.38	0.33	0.56 ± 0.18
$R^2_{GTPs/RPE}$	0.79‡	0.79‡	0.70‡	0.67‡	0.58‡	0.44‡	0.47‡	0.41‡	0.34	0.26	0.54 ± 0.19
$R^2_{Points/TL}$	0.04	0.002	0.03	0.01	0.11	0.07	0.05	0.06	0.02	0.13	0.05 ± 0.04
$R^2_{Points/RPE}$	0.02	0.003	0.23	0.001	0.01	0.05	0.06	0.04	0.05	0.11	0.06 ± 0.07
$R^2_{SJFT/TL}$	0.31	0.01	0.06	0.49	0.33	0.01	0.04	0.25	0.07	0.05	0.10 ± 0.12
$R^2_{SJFT/RPE}$											

*GTP = global training performance; TL = training load; RPE = rating of perceived exertion; SJFT index = special judo fitness test index.

†Individual values and mean ± SD of different coefficient of determination expressed without unit. $R^2_{GTP/TL}$, $R^2_{GTPs/TL}$, $R^2_{GTP/RPE}$, $R^2_{GTPs/RPE}$, $R^2_{Points/TL}$, $R^2_{Points/RPE}$, and $R^2_{SJFT/RPE}$ have been obtained by computing model 1.

‡ $p \leq 0.05$.

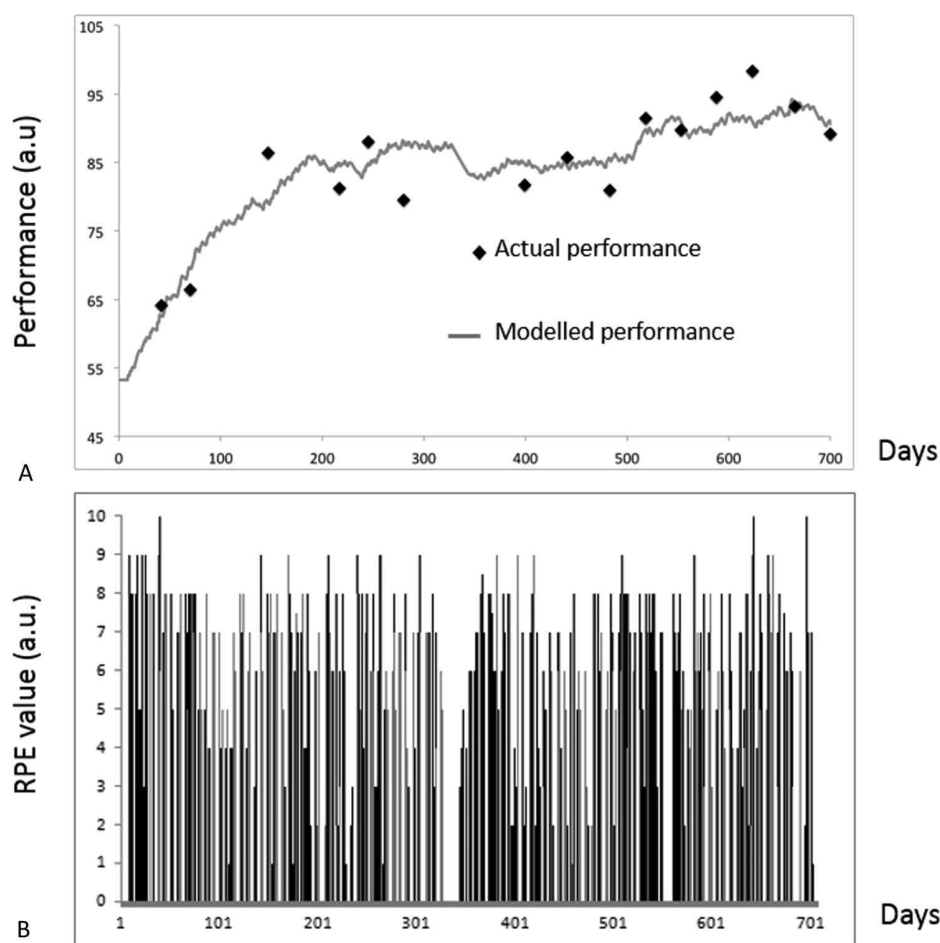


Figure 2. Application of the model on subject 2. A) Modelled (grey line) and actual (black dots) performance in response to training load. B) Evolution of training load, quantified directly from the RPE value (black bar = session 1; grey bar = session 2) over the 702 days of experiment. RPE = rating of perceived exertion.

investigated (33). However, no long-term training modeling study about combat sports was found. Studies investigating training modeling in sports with high technical-tactical components and dual confrontations are needed to verify the feasibility of such approach in these sports. Additionally, the comparison of different quantification procedures of both training loads (TLs) and performance in combat sports was not extensively tested. Thus, the objective of this study was to determine the methods of quantification for training and performance, which would be the most appropriate for modeling the responses to long-term training in cadet and junior judo athletes.

METHODS

Experimental Approach to the Problem

The TL was quantified through the session RPE and expressed in arbitrary unit (a.u.). Rating of perceived exertion

was measured from the Foster session RPE scale (12), which was presented to the athletes 30 minutes after each training session. Training load was calculated from 2 methods, that is, the product of the duration of the training session in minute and the RPE value and directly from the RPE value provided by the Foster scale. This method was previously validated for combat sports athletes (21,22,28–30,32,40), and the Portuguese version was already used in combat sports athletes (28,29,32,40).

At the beginning of the general preparatory period, the 10 judo athletes were submitted to technical, *randori* (combat simulation), and strength and conditioning training sessions twice with 1-week interval. Because the training sessions were identical and had the same duration, we used the RPE and TL of each type of session to calculate the reliability of these variables. The following results were found: (a) technical training session (80-minute

TABLE 2. Indicators of goodness-of-fit of performance for various system models of training effects.*

Subject	N	Model 1 (<i>df</i> = 2)		Model 2 (<i>df</i> = 4)		<i>R</i> ² gain between model 2 and 1	
		<i>R</i> ² _{model 1}	Adj <i>R</i> ²	<i>R</i> ² _{model 2}	Adj <i>R</i> ²	<i>f</i> -ratio	<i>p</i>
1	15	0.79	0.76†	0.82	0.75†	0.833	0.463
2	15	0.79	0.76†	0.79	0.71†	0	1
3	15	0.70	0.65†				
4	15	0.67	0.62†				
5	15	0.58	0.51†	0.65	0.51†	1.000	0.402
6	15	0.44	0.35†	0.46	0.24	0.185	0.834
7	15	0.47	0.38†	0.77	0.68†	6.522	0.015‡
8	15	0.41	0.31†	0.45	0.23	0.364	0.704
9	15	0.34	0.23	0.35	0.09	0.077	0.927
10	15	0.26	0.14	0.44	0.22	1.607	0.248
Mean ± <i>SD</i>		0.55 ± 0.19	0.51 ± 0.2	0.59 ± 0.19	0.46 ± 0.26		

*Model 1, model using 1 first-order component; model 2, model using 2 first-order components; *N*, number of measurements of performance; Adj *R*², adjusted coefficient of determination.

†Significance of the fit: *p* ≤ 0.05.

‡Statistical difference from model 1 components: *p* ≤ 0.05.

duration)—RPE session 1 = 3.5 ± 0.7 a.u.; TL session 1 = 276 ± 58 a.u.; RPE session 2 = 4.1 ± 1.1 a.u.; TL session 2 = 324 ± 85 a.u.; RPE intraclass correlation coefficient (ICC) = 0.64; RPE limits of agreement = -2.47 to 1.27 (mean difference = -0.60); TL ICC = 0.64; TL limits of agreement = -197.9 to 101.9 (mean difference = -48.0); (b) *randori* training session (80-minute duration)—RPE session 1 = 6.5 ± 1.0 a.u.; TL session 1 = 516 ± 77 a.u.; RPE session 2 = 6.5 ± 1.2 a.u.; TL session 2 = 520 ± 100 a.u.; RPE ICC = 0.94; RPE limits of agreement = -1.15 to 1.05 (mean difference = 0.05); TL ICC = 0.94; TL limits of agreement = -92.0 to 84.0 (mean difference = -4.0); and (c) strength and conditioning training session (60-minute duration)—RPE session 1 = 5.2 ± 0.8 a.u.; TL session 1 = 312 ± 47 a.u.; RPE session 2 = 4.9 ± 0.9 a.u.; TL session 2 = 294 ± 54 a.u.; RPE ICC = 0.79; RPE limits of agreement = -1.13 to 1.73 (mean difference = 0.30); TL ICC = 0.79; TL limits of agreement = -67.8 to 103.8 (mean difference = 18.0). Thus, good reliability values were obtained using this method in different types of training sessions in young judo athletes.

Subjects

For the present analysis, 10 young male judo athletes competing at a regional/state level took part in the study with mean ± *SD* age, body mass, and height of, respectively, 15.9 ± 1.3 years, 64.9 ± 10.3 kg, and 170.8 ± 5.4 cm at the beginning of the study. Their mean training volume was 6.52 ± 0.43 hours per week during the preparatory periods and 4.75 ± 0.49 hours per week during the competitive periods. Their time of judo practice was 6.0 ± 1.9 years, including 2.7 ± 1.1 years registered at the São Paulo State Judo Federation. Data were collected during a 2-year training period

(i.e., 702 days) from January 2011 to December 2012. They followed a training program prescribed by the same coach. The athletes and their parents were fully informed and provided their written consent before entering the investigation. All procedures were approved by the local Ethics Committee.

Performance Quantification

Performance was quantified from 5 parameters and divided into 2 categories: performance in competition and performance in training. The evaluation of performance in competition was based on the number of points per level. This value was specifically given by the coach for each competition considering the level (departmental, regional, state) and the number of matches won in each competition. Briefly, points per match won varied from 4 (regional and friendly competitions) to 40 points (national competitions). This was an adaptation of the Cadet and Junior International Ranking List proposed by the International Judo Federation. Performance was assessed through 4 different tests. A physical test battery consisting of a standing long jump, 2 judo-specific tests that were the maximal number of dynamic chin-up holding the judogi (1,16), the number of throws in the SJFT (15,35,36), and a specific index developed for judo (number of throws/[*HR*_{max} − *HR*_{recovery}]) (SJFT index) (15,17,19,35) was used. These tests were performed on Sunday, after a standardized short warm-up.

The standing jump test consisted in 3 trials with at least 1-minute rest in-between. The best value was retained as the performance criterion. The number of dynamic chin-ups test from a single maximal execution was considered. The total number of throws during the 3 sets (*A* = 15 seconds, *B* and *C* = 30 seconds each, with a 10-second rest between

consecutive sets) of the SJFT was registered from a single execution. Athletes were familiarized with all procedures, and these tests were described as highly reliable (10,15,34). The ICC for the SJFT variables in our laboratory, using a similar sample, was as follows: throws (0.73), heart rate (HR) after the test (0.93), HR 1 minute after the test (0.89), and index (0.89). The chin-up holding the judogi test had an ICC of 0.98 and limits of agreement of -2.9 to 2.3 repetitions (mean difference of -0.3 repetition). The standing jump test presents a high ICC (0.95) and low coefficient of variation (2.4%) (26). We retained 2 combinations of these tests in the calculation of the training performance, with the objective to check whether TL would be related better with 3 or 2 tests combination, which would provide the coach the possibility to use a smaller number of test to monitor the athletes' performance. The global training performance (GTP) was determined as follows:

$$\begin{aligned} \text{GTP} = & k_a \text{ standing jump} \\ & + k_b \text{ number of dynamic chin-ups} \\ & + k_c \text{ total number of throws,} \end{aligned}$$

where k_a , k_b , and k_c are the respective weighting coefficients for each test. The values of these coefficients are 0.05, 0.45, and 0.50, respectively. They were determined based on time-motion analysis (27) and physiological analysis (13) of judo matches, which have a high demand on repeated all-out efforts as presented in the SJFT, upper-body strength endurance as evaluated by the chin-up dynamic test, and a lower number of actions involving lower-body muscle power during technique application, which was evaluated by the long-standing jump. For the second combination, simplified GTP was computed as follows:

$$\begin{aligned} \text{GTPs} = & k \text{ number of dynamic chin-ups} \\ & + k \text{ total number of throws,} \end{aligned}$$

where k is 0.5 dynamic chin-ups and the total number of throws having an equivalent weighting factor in this simplified performance criterion.

Mathematical Modeling

System modeling for describing training adaptations consisted of mathematically relating the TL of the training sessions (system input) to the change in performance (system output) (Figure 1).

For this study, 1 mathematical model based on only 1 first-order filter effect of training on performance with an impulse response $k_1 \cdot e^{-t/\tau_1}$ was used (7).

Performance $p(t)$ is obtained by adding the basic level of performance p_0 to the convolution product of training dose $w(t)$ with the impulse response. The $w(t)$ is considered as a discrete function, that is, a series of impulse each day, w_i at day i . The convolution product becomes a summation in

which model performance \hat{p}^n on day n is estimated by mathematical recursion from the series of w_i and is, thus, estimated as follows:

$$\hat{p}^n = p_0 + k_1 \sum_{i=1}^{n-1} w_i e^{-(n-i)/\tau_1}. \quad (1)$$

The 2 parameters of the model were obtained from the fitting of the measured performances and the modeled ones by the minimization of the residual sum of squares (RSS) between them

$$\text{RSS} = \sum_{n=1}^N [p^n - \hat{p}^n]^2, \quad (2)$$

with n taking the N values corresponding to the days of measurement of the measured performances.

Statistical Analyses

Selected data were expressed as mean \pm SD. The goodness of the fit of performance was assessed with the coefficient of determination (R^2). The statistical significance of the model fit was tested for each subject by using analysis of variance of the residuals in accordance with the degree of freedom of the model ($df=2$).

RESULTS

The quality of the fit between TL and performance was similar, whether the TL was computed directly from RPE or from the classical method of Foster (i.e., session RPE) according to which the TL is calculated from the product of RPE by time of training session. Indeed, $R^2_{\text{GTP/TL}}$ and $R^2_{\text{GTP/RPE}}$ were, respectively, 0.55 ± 0.18 and 0.56 ± 0.18 and significant in 7 ($R^2_{\text{GTP/TL}}$) and 8 ($R^2_{\text{GTP/RPE}}$) subjects over 10 (Table 1).

Concerning the quantification of performance variations, no significant relation could be successfully established between the number of points per level in competition and TL or RPE value (respectively, $R^2_{\text{Points/TL}}$ and $R^2_{\text{Points/RPE}}$; $p > 0.05$; Table 1). Thus, we looked for training performance criteria. Both GTP and GTPs provided good correlations with RPE because $R^2_{\text{GTP/RPE}}$ and $R^2_{\text{GTPs/RPE}}$ were 0.56 ± 0.18 and 0.54 ± 0.19 , respectively (Table 1), excluding the standing jump from the computation of the TL, leading to a simplest method. Furthermore, no significant correlation between SJFT and TL could be evidenced ($p > 0.05$; Table 1). In this analysis, the optimal combination retained was the correlation between RPE and GTPs. The typical curve of correlation between actual and modeled performance in response to TL is shown in Figure 2.

For the 10 athletes, the variation of the mean TL between the first and the second year was not significant ($p > 0.05$), whereas the GTP increased by $27.09 \pm 10.7\%$ during the 2 years of the studied period ($p < 0.001$) (Table 2).

DISCUSSION

This study is the first attempt to model the training response of a combat sport. The most important finding of this study was the significant relationship between TL and performance quantification. Surprisingly, (a) the method of Foster developed (i.e., session RPE) to quantify TL was less adapted than the simplest method based only on the scale (i.e., RPE value) to appreciate the intensity of the training sessions and (b) the classical SJFT index was less appropriated to describe the performance variations than the combination of dynamic chin-up holding the judogi and the number of throws during the SJFT.

Wallace et al. (41) used, among other methods, the session RPE to quantify TL and to verify its relationship with performance in runners and observed a correlation of 0.60 ± 0.10 between modeled and actual performance. As a possible explanation for the moderate relationship found, authors reported that they had observed a poor sensitivity to small changes in intensity during moderate-to-hard exercise when using the session RPE scale and recommended the substitution of the CR-10 scale by a CR-100 or 6–20 RPE scales as a possible solution to improve the sensibility of TL quantification. The quantification of the TL by the Borg scale takes into consideration the difficulty of the training session by appreciating both its intensity and duration. The Foster method consisting in multiplying both difficulty and duration of the daily TL takes into account in reality twice the duration leading to a minimization of the intensity impact on the TL. Consequently, the Foster method was less adapted than the simple quantification by the scale (i.e., RPE value). Alternative methods based on HR zones (4) or number of movement repetitions weighted by specific coefficients (6,33) would be also tested in future studies with judo athletes.

Otherwise, in this study, the best criteria to quantify performance would have been to use directly the results in competition. However, our analysis indicated that the number of points per level did not constitute a good indicator, as no significant correlation could be established between this criterion and the dynamic of TL (Table 1). This result is easily comprehensible, so far as the level of the opponent was not included in this performance criterion. Except for the international level judo athletes who are ranked by the International Judo Federation, following the same criteria, this aspect is hard to evaluate for other athletes. Alternatively, to consider the results in competitions, a technically and tactically homogeneous group of judo athletes taking part in the same competitions should be analyzed, which is quite difficult to investigate and control during such a long period. Thus, the natural alternative solution would have been to use a performance criterion included in the training schedule of judo athletes. The specific test developed for judo, SJFT index, was the first candidate test. Nevertheless, no significant relationship has been evidenced between this index and RPE

($p > 0.05$; Table 1). Interestingly, better results were obtained by simplifying this test to the combination of number of throws to the number of dynamic chin-ups and standing long jump (i.e., GTP). The best relationship between this global training test and the dynamic of TL was obtained. Finally, the simplification of the GTP by excluding the standing long jump (i.e., GTPs) provided similar results (Table 1).

The practice of judo requires tactical, technical, and physical development. Modeling training response could lead to an optimization of the training prescription and can improve our knowledge on the effects of training on performance. Nevertheless, the limitations of the modeling approach need to be taken in consideration. The mean R^2 value obtained in this study (0.54 ± 0.19 ; $n = 10$) could be compared with the results obtained for swimmers (0.56 ± 0.06) (39), reflecting the high degree of complexity of the judo practice especially as this result was obtained from a model taking into account 1 transfer function, whereas in the study on swimmers, the extended model proposed by Busso (5) was successfully applied because of a greater number of performance tests (32 ± 3.8).

The model proposed by Banister et al. (3) was the most used one, which includes 2 components: 1 reflecting the long-term adaptation to training (positive effect as for the simpler model used in this study) and 1 reflecting the negative effects of training on performance (i.e., fatigue). We have unsuccessfully tested the model of Banister on our data. For example, when using RPE value and GTPs for quantifying the training and the performance, respectively, the fitting was significant in only 4 subjects for the model of Banister because of the addition of further parameters. It is noteworthy that the df of this model is 4, whereas the df of the model used in this study was only 2. The R^2 adjusted to the number of model parameters was lower with the model of Banister (0.46 ± 0.26) than the model with only 1 component used in this study (0.51 ± 0.2). Furthermore, an F -test on the decrease in residuals according to the increase in model parameters (8) showed that the addition of a negative component in the model gave a significantly better fit in only 1 subject. It was the reason why we have retained the model with only 1 component in this study (Table 2).

A possible explanation of the unsuccessful application of the Banister model could be that the measures of performance were too space out. It suggests that for sports involving a highly complex coordination and both technical and physical capacities, performance needs to be measured more frequently if the negative component of training (i.e., fatigue) wants to be evidenced as it has been shown in the study of Sanchez et al. (33), where 33 performance measures have been collected in 3 months in elite gymnasts. Thus, by including several times a week after the training session the simple testing procedure including number of throws and the number of dynamic chin-ups, it would be possible to reduce the average lapse time between 2 measures of performance (i.e., 48.5 ± 1.7 days in our study).

The TL stayed significantly constant between the 2 years of the experiment, suggesting that the perception of the training session intensity expressed by the RPE was reliable to estimate TL because all the athletes had the same coach and a constant training program over the 2 years of the experiment. However, it is important to emphasize that the GTP increased by $27.09 \pm 10.7\%$ during the 2 years of the studied period. This can be explained by the fact that the performance test battery is based on both physical and technical development, especially the number of throws in the SJFT. Thus, a technical improvement may have resulted in increased performance independently from the TL. Moreover, the use of the training impulse (TRIMPS) method of Banister on the whole session including the recovery period could constitute a solution in so far as the anaerobic component that slips from measure of the HR during the exercise becomes perceptible if the recovery HR is also taken into account. Nevertheless, the session RPE method for TL quantification can be considered as a good indicator for most of the athletes, as the TL stayed constant.

The aim of this study was to determine whether the session RPE training quantification method was appropriate to modeling the responses to long-term training in cadet and junior judo athletes. In conclusion, this study has shown that the best relationships between amounts of training and changes in performance were obtained when training amounts were quantified simply from RPE. Furthermore, best results were obtained when the performance was quantified using a combined criterion that includes maximal specific movement repetitions of chin-ups gripping the judogi and throws during the SJFT, excluding the standing jump test so far, as including this test in the GTP did not enhance the correlation coefficient. Based on this preliminary study, it is now possible to move to a systematic approach of training response especially with a frequent monitoring of performance based on simple tests included in the training program of judo athletes. The goal is to attain a reliable description of the training process in complex disciplines such as combat sports to have access to models to simulate training strategies and to optimize the planning of future training.

PRACTICAL APPLICATIONS

Proper training monitoring is a key component to understand training adaptation and improve training prescription. Although judo-specific tests have been developed, the comprehension of the impact of TL on performance change in these tests throughout the season was not investigated previously. The results of this study demonstrated that simply monitoring the RPE can predict more than 50% of the variance on performance changes in judo-specific tests (i.e., gripping strength endurance performance and number of throws during a high-intensity intermittent test). Thus, coaches should include the monitoring of RPE in each training session to better understand the variation on

judo-related performance. Additionally, this approach can be improved over the years and specific decision making concerning the proper stimulus for each athlete can be developed, which can guarantee the application of the individualization training principle.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Brazilian Sports Ministry and the CNPq for the financial support to conduct this study (process number 487302/2013-3).

REFERENCES

1. Aruga, S, Nakanishi, H, Yamashita, Y, Onda, T, and Ubukata, K. A study of the training method for improving judo players' kumite strength on the judogi chin-up method. *Tokai J Sports Sci* 18: 44–53, 2006.
2. Ball, N, Nolan, E, and Wheeler, K. Anthropometrical, physiological, and tracked power profiles of elite taekwondo athletes 9 weeks before the Olympic competition phase. *J Strength Cond Res* 25: 2752–2763, 2011.
3. Banister, EW, Calvert, IW, Savage, MV, and Bach, IM. A system model of training for athletic performance. *Aust J Sports Med* 7: 57–61, 1975.
4. Banister, EW and Hamilton, CL. Variations in iron status with fatigue modeled from training in female distance runners. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 54: 16–23, 1985.
5. Busso, T. Variable dose-response relationship between exercise training and performance. *Med Sci Sports Exerc* 35: 1188–1195, 2003.
6. Busso, T, Candau, R, and Lacour, JR. Fatigue and fitness modelled from the effects of training on performance. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 69: 50–54, 1994.
7. Busso, T, Carasso, C, and Lacour, JR. Adequacy of a systems structure in the modeling of training effects on performance. *J Appl Physiol* (1985) 71: 2044–2049, 1991.
8. Busso, T, Häkkinen, K, Pakarinen, A, Carasso, C, Lacour, JR, Komi, PV, and Kauhanen, H. A systems model of training responses and its relationship to hormonal responses in elite weight-lifters. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 61: 48–54, 1990.
9. Busso, T and Thomas, L. Using mathematical modeling in training planning. *Int J Sports Physiol Perform* 1: 400–405, 2006.
10. Chu, DA. *Explosive Power and Strength*. Champaign, IL: Human Kinetics, 1996.
11. Eston, R. Use of ratings of perceived exertion in sports. *Int J Sports Physiol Perform* 7: 175–182, 2012.
12. Foster, C, Florhaug, JA, Franklin, J, Gottschall, L, Hrovatin, LA, Parker, S, Doleshal, P, and Dodge, C. A new approach to monitoring exercise training. *J Strength Cond Res* 15: 109–115, 2001.
13. Franchini, E, Artioli, GG, and Brito, CJ. Judo combat: Time-motion analysis and physiology. *Int J Perform Anal Sport* 13: 624–641, 2013.
14. Franchini, E, Del Vecchio, F, and Sterkowicz, S. A special judo fitness test classificatory table. *Arch Budo* 5: 127–129, 2009.
15. Franchini, E, Del Vecchio, FB, Matsushige, KA, and Artioli, GG. Physiological profiles of elite judo athletes. *Sports Med* 41: 147–166, 2011.
16. Franchini, E, Miarka, B, Matheus, L, and Del Vecchio, FB. Endurance in judogi grip strength tests: Comparison elite and non-elite judo players. *Arch Budo* 7: 1–4, 2011.
17. Franchini, E, Nakamura, FY, Takito, MY, Kiss, MAPDM, and Sterkowicz, S. Specific fitness test developed in brazilian judoists. *Biol Sport* 15: 165–170, 1998.
18. Franchini, E, Sterkowicz, S, Meira, CM, Gomes, FR, and Tani, G. Technical variation in a sample of high level judo players. *Percept Mot Skills* 106: 859–869, 2008.

19. Franchini, E, Sterkowicz, S, Szmatlan-Gabrys, U, Gabrys, T, and Garnys, M. Energy system contributions to the special judo fitness test. *Int J Sports Physiol Perform* 6: 334–343, 2011.
20. Franchini, E, Takito, MY, Kiss, MAPDM, and Sterkowicz, S. Physical fitness and anthropometrical differences between elite and non-elite judo players. *Biol Sport* 22: 315–328, 2005.
21. Haddad, M, Chaouachi, A, Castagna, C, Wong, DP, Behm, DG, and Chamari, K. The construct validity of session RPE during an intensive camp in young male Taekwondo athletes. *Int J Sports Physiol Perform* 6: 252–263, 2011.
22. Haddad, M, Chaouachi, A, Wong, DP, Castagna, C, Hue, O, Impellizzeri, FM, and Chamari, K. Influence of exercise intensity and duration on perceived exertion in adolescent Taekwondo athletes. *Eur J Sport Sci* 14: 275–281, 2014.
23. Julio, UF, Panissa, VL, Miarka, B, Takito, MY, and Franchini, E. Home advantage in judo: A study of the world ranking list. *J Sports Sci* 31: 212–218, 2013.
24. Julio, UF, Takito, MY, Mazzei, L, Sterkowicz, S, and Franchini, E. Tracking 10-year competitive winning performance of judo athletes across age groups. *Percept Mot Skills* 113: 139–149, 2011.
25. Koga, T, Umeda, T, Kojima, A, Tanabe, M, Yamamoto, Y, Takahashi, I, Iwasaki, H, Iwane, K, Matsuzaka, M, and Nakaji, S. Influence of a 3-month training program on muscular damage and neutrophil function in male university freshman judoists. *Luminescence* 28: 136–142, 2013.
26. Markovic, G, Dizdar, D, Jukic, I, and Cardinale, M. Reliability and factorial validity of squat and countermovement jump tests. *J Strength Cond Res* 18: 551–555, 2004.
27. Miarka, B, Panissa, VLG, Julio, UF, Del Vecchio, FB, Calmet, M, and Franchini, E. A comparison of time-motion performance between age groups in judo matches. *J Sports Sci* 30: 899–905, 2012.
28. Milanez, VF and Pedro, RE. Application of different load quantification methods during a karate training session. *Rev Bras Med Esporte* 18: 278–282, 2012.
29. Milanez, VF, Spiguel Lima, MC, Gobatto, CA, Perandini, LA, Nakamura, FY, and Ribeiro, LFP. Correlates of session-rate of perceived exertion (RPE) in a karate training session. *Sci Sports* 26: 38–43, 2010.
30. Padulo, J, Chaabène, H, Tabben, M, Haddad, M, Gevat, C, Vando, S, Maurino, L, Chaouachi, A, and Chamari, K. The construct validity of session RPE during an intensive camp in young male Karate athletes. *Muscles Ligaments Tendons J* 4: 121–126, 2014.
31. Papacosta, E, Gleeson, M, and Nassis, GP. Salivary hormones, IgA, and performance during intense training and tapering in judo athletes. *J Strength Cond Res* 27: 2569–2580, 2013.
32. Perandini, LA, Siqueira-Pereira, TA, Okuno, NM, Soares-Caldeira, LF, and Nakamura, FY. Use of session RPE to training load quantification and training intensity distribution in taekwondo athletes. *Sci Sports* 27: 25–30, 2012.
33. Sanchez, AM, Galbès, O, Fabre-Guery, F, Thomas, L, Douillard, A, Py, G, Busso, T, and Candau, RB. Modelling training response in elite female gymnasts and optimal strategies of overload training and taper. *J Sports Sci* 31: 1510–1519, 2013.
34. Silva, BVC, Marocolo Júnior, M, Simim, MAM, Rezende, FN, Franchini, E, and Mota, GR. Reliability in kimono grip strength tests and comparison between elite and non-elite Brazilian Jiu-Jitsu players. *Arch Budo* 8: 103–107, 2012.
35. Sterkowicz, S. Special judo fitness test for judo. *Antropomotoryka* 12: 29–44, 1995.
36. Sterkowicz, S, Zuchowicz, A, and Kubica, R. Levels of anaerobic and aerobic capacity indices and results for the special judo fitness test in judo competitors. *J Hum Kinet* 21: 115–135, 1999.
37. Suzuki, S, Sato, T, Maeda, A, and Takahashi, Y. Program design based on a mathematical model using rating of perceived exertion for an elite Japanese sprinter: A case study. *J Strength Cond Res* 20: 36–42, 2006.
38. Tabben, M, Sioud, R, Haddad, M, Franchini, E, Chaouachi, A, Coquart, J, Chaabane, H, Chamari, K, and Tourny-Chollet, C. Physiological and perceived exertion responses during international karate kumite competition. *Asian J Sports Med* 4: 263–271, 2013.
39. Thomas, L, Mujika, I, and Busso, T. A model study of optimal training reduction during pre-event taper in elite swimmers. *J Sports Sci* 26: 643–652, 2008.
40. Uchida, MC, Teixeira, LFM, Godoi, VJ, Marchetti, PH, Conte, M, Coutts, AJ, and Bacurau, RFP. Does the timing of measurement alter session-RPE in boxers? *J Sports Sci Med* 13: 59–65, 2014.
41. Wallace, LK, Slattery, KM, and Coutts, AJ. A comparison of methods for quantifying training load: Relationships between modelled and actual training responses. *Eur J Appl Physiol* 114: 11–20, 2014.
42. Wood, RE, Hayter, S, Rowbottom, D, and Stewart, I. Applying a mathematical model to training adaptation in a distance runner. *Eur J Appl Physiol* 94: 310–316, 2005.
43. Zaggelidis, G and Lazaridis, S. Evaluation of vertical ground reaction forces in three different judo throwing techniques in novice and advanced Greek athletes. *Med Sport* 65: 29–36, 2012.
44. Zaggelidis, G, Lazaridis, SN, Malkoglorgos, A, and Mavrovouniotis, F. Differences in vertical jumping performance between untrained males and advanced Greek judokas. *Arch Budo* 8: 87–90, 2012.

Conclusion

Cette étude est à notre connaissance la première à proposer une méthode simple et reproductible de quantification de la charge d'entraînement et de la performance dans une activité sportive contre opposant.

Les résultats montrent (1), un modèle à simple fonction de transfert suffit ici à décrire les effets de l'entraînement sur la performance, et (2), une quantification de la charge par simple évaluation avec une échelle de type RPE et de la performance par une combinaison de deux tests spécifiques au judo réalisés régulièrement pendant l'entraînement déterminent la meilleure relation entre la charge d'entraînement et la performance. La quantification de la charge d'entraînement par simple RPE a déterminé de meilleurs résultats que la quantification par la méthode de Foster où le RPE est multiplié par la durée de la séance d'entraînement (Foster *et al.*, 1996). Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où la valeur du RPE rapportée par l'athlète, le paramètre durée de la séance est déjà pris en compte. Par exemple, une séance d'une heure paraîtra moins fatigante qu'une séance de deux heures, réalisé avec les mêmes exercices, et la même intensité. Dans nos conditions, la multiplication du RPE par la durée de la séance semble ajouter du bruit dans la quantification de la charge, venant réduire la qualité de l'ajustement du modèle.

Bien que l'utilisation du RPE ou de la méthode de Foster soit très répandue dans de nombreuses activités physiques, qu'elles soient d'endurance (Foster *et al.*, 2001; Wallace *et al.*, 2009), de résistance (Day *et al.*, 2004; Sweet *et al.*, 2004) ou en équipe (Impellizzeri *et al.*, 2004; Alexiou & Coutts, 2008) son emploi comme méthode de quantification des charges d'entraînement dans la modélisation des effets de l'entraînement correspond à une approche essentiellement descriptive. C'est pour s'approcher un peu plus d'un modèle physiologique, établi sur des données biologiques que les études 2 et 3 ont été conduites. L'application de la théorie des systèmes à l'entraînement chez l'animal ouvre la porte à de nombreuses perspectives telles que les possibilités déjà évoquées de caractériser les composants du système de réponse à l'entraînement et présente en outre l'avantage de contrôler finement les conditions expérimentales.

Etude 2 : Modélisation de la réponse à l'entraînement en résistance dans une étude expérimentale chez l'animal

Article 2

Modeling response to resistance training in an animal experiment study.

Biomed Res Int. 2015 ; 2015:914860

Philippe AG, Py G, Favier FB, Sanchez AM, Bonnieu A, Busso T et Candau RB.

Introduction

Depuis le premier modèle proposé par Banister, la théorie des systèmes a toujours été employée pour suivre la réponse à l'entraînement chez les sportifs, toutes disciplines confondues (Banister *et al.*, 1975). Cependant, le modèle humain présente de nombreuses limites. Selon Banister, la théorie des systèmes est une simple relation dose-réponse où l'entraînement est réduit à une simple charge mécanique imposée à l'organisme et où la performance est déterminée uniquement par cette charge. Bien que cette simplification soit un prérequis à l'application d'un modèle, il paraît évident que d'autres facteurs modulent la réponse à l'entraînement, et donc la performance. L'état émotionnel (stress, motivation), la qualité du sommeil ou encore l'alimentation, déterminent également la performance à l'exercice indépendamment de la charge d'entraînement (Wood *et al.*, 2005; Pyne *et al.*, 2009; Hagin *et al.*, 2012). A cela viennent s'ajouter les facteurs génétiques qui peuvent influencer la réponse à une même dose de travail. On estime d'ailleurs que chez l'Humain, une part significative de la performance est liée au patrimoine génétique (Santos *et al.*, 2015). Ces variabilités individuelles rendent imprécis l'application d'un modèle. Une solution consiste en une analyse mixte, qui combine des paramètres individuels et des paramètres communs à l'ensemble du groupe et qui permet d'augmenter la robustesse dans la détermination des paramètres du modèle (Davidian & Giltinan, 1995; Avalos *et al.*, 2003; Busso & Flück, 2013).

L'objectif de cette étude est de tester l'applicabilité de la théorie des systèmes, par l'emploi du modèle classique de Banister combiné à une analyse mixte chez des rats entraînés en résistance. De cette manière, des facteurs responsables de variabilité individuelle sont contrôlés et considérablement réduits.

Research Article

Modeling the Responses to Resistance Training in an Animal Experiment Study

Antony G. Philippe,^{1,2,3} Guillaume Py,^{1,2,3} François B. Favier,^{1,2,3} Anthony M. J. Sanchez,⁴ Anne Bonnieu,^{1,2,3} Thierry Busso,⁵ and Robin Candau^{1,2,3}

¹INRA, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, 34000 Montpellier, France

²UFR STAPS, Université Montpellier 1, 34000 Montpellier, France

³Université Montpellier 2, 34000 Montpellier, France

⁴Laboratoire Européen Performance Santé Altitude, Département STAPS, Université de Perpignan EA 4604, Via Domitia, 66120 Font-Romeu, France

⁵Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon, 42000 Saint-Etienne, France

Correspondence should be addressed to Antony G. Philippe; antony.philippe@univ-montpl.fr and Robin Candau; robin.candau@univ-montpl.fr

Received 16 October 2014; Accepted 26 December 2014

Academic Editor: Heide Schatten

Copyright © Antony G. Philippe et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The aim of the present study was to test whether systems models of training effects on performance in athletes can be used to explore the responses to resistance training in rats. 11 Wistar Han rats (277 ± 15 g) underwent 4 weeks of resistance training consisting in climbing a ladder with progressive loads. Training amount and performance were computed from total work and mean power during each training session. Three systems models relating performance to cumulated training bouts have been tested: (i) with a single component for adaptation to training, (ii) with two components to distinguish the adaptation and fatigue produced by exercise bouts, and (iii) with an additional component to account for training-related changes in exercise-induced fatigue. Model parameters were fitted using a mixed-effects modeling approach. The model with two components was found to be the most suitable to analyze the training responses ($R^2 = 0.53$; $P < 0.001$). In conclusion, the accuracy in quantifying training loads and performance in a rodent experiment makes it possible to model the responses to resistance training. This modeling in rodents could be used in future studies in combination with biological tools for enhancing our understanding of the adaptive processes that occur during physical training.

1. Introduction

Adaptations to training are related to the amount of work performed during the exercise sessions. The sum of these inputs yields increases and decreases in performance capacity because both adaptation and fatigue are produced by exercise bouts. Systems models have been developed to quantify these antagonistic effects of physical exercise on human performance. In 1975, Banister et al. [1] proposed the first and most frequently used model, which includes two components in order to distinguish the adaptations and fatigue that occur with training. A simpler model with only one component was also proposed to analyze the biological responses induced by endurance training [2]. The most complex model is an

extension of that proposed by Banister et al., in which the response to a single exercise depends on past training [3]. Using such models with data from animal experiments would offer the opportunity to go beyond the simple quantification of the relationship between the amount of exercise training and performance and would thereby improve our knowledge about the nature of the adaptive processes that take place during training.

Modeling training effects in rodents presents several advantages over models in athletes. Animal models allow the measurement of training effects for a broad range of training situations, loads, and intensities, which would be unethical in athletes. Moreover, the training load and performance

TABLE 1: Change in additional loads lifted by rats during the training program.

Training sessions	Load (% body mass)	Mean load \pm SD (g)
1 to 5	50	143.8 ± 10.2
6	80	248 ± 20.1
7 and 8	100	312.6 ± 24.6
9 to 13	120	397.1 ± 34.7
14 to 16	130	450.9 ± 37.8
17 and 18	140	497.5 ± 41.6
19	150	539.7 ± 47.6

can be controlled with high precision, especially in the context of resistance exercise (RE) on a climbing ladder. This precision enables researchers to capture small details of the training process and, ultimately, to optimize the structure of the model itself. Rodent models authorize greater invasiveness, yield more biological information, and therefore provide greater insight into the adaptive processes that occur during training, particularly regarding the link between the adaptive cell mechanisms and training effects. In addition, the animal model could reduce the sources of variability in response to training compared with a human model. The interindividual variability is naturally decreased in animals with the same genetic background. Obviously, parameters external to training (nutrition, sleep quality, fatigue related to activities other than training, etc.) are controlled in animals as opposed to humans. This homogeneity in the responses to physical exercise in animals allows us to take advantage of mixed-effects modeling to analyze the responses of a group of animals, taking interindividual variability into consideration. When repeated measurements are made on several related statistical units, mixed-effects modeling allows a more robust estimation of model parameters than using only available individual data [4–6]. The single-individual model has generally been used in human studies, with the exception of one work in which the mixed-effects model was applied to a group of elite swimmers [7].

Among the training programs, RE is particularly suitable for animal studies because RE is associated with high gains in performance, muscle strength, and muscle fiber cross-sectional area. RE is characterized by exercise performed between 60% and 80% of the maximum load, and several experimental models have been developed to evaluate muscle and physical performance in response to RE. In rats, voluntary exercise based on ladder climbing activity has been shown to induce muscle hypertrophy, changes in muscle typology, and increased force and power output [8]. One of the first studies using ladder climbing as a model of resistance training [9] showed that, after 26 weeks of resistance training, the trained rats were able to climb 40 cm while carrying up to 140% of their body mass, without changes in the ratio between body and muscle (EDL and soleus) mass, in comparison with controls. More recently we found that rats could climb 1 meter while carrying 150% of their body mass after 4 weeks of resistance training, in association with hypertrophy of 48% of fiber IIX in FDP muscle [10]. After 8 weeks, the rats

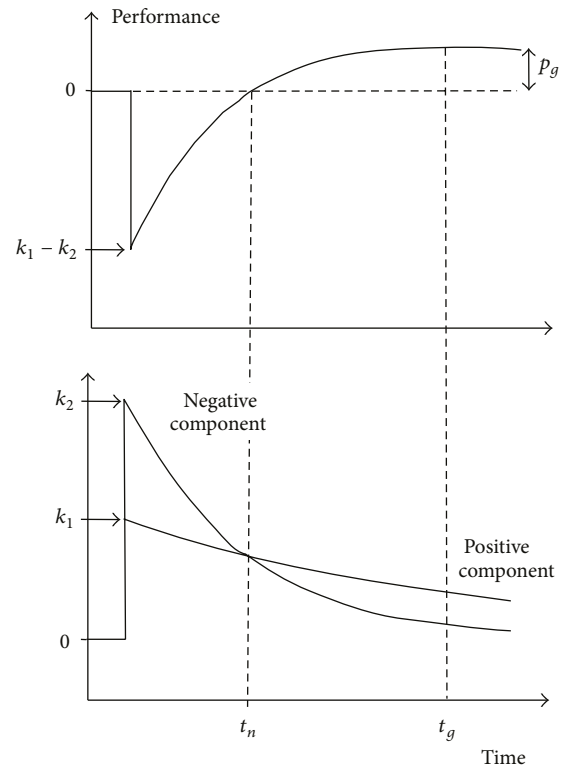


FIGURE 1: Schematic representation of the response to 1 unit of training according to Model-2Comp. Performance results from the difference between two training components. In the case where k_2 is greater than k_1 , performance decreases first after the training bout. Afterwards, the negative component decreases more quickly than the positive component, in the case where t_1 is greater than t_2 , resulting in performance recovery and peaking when the difference between the negative and positive components is the greatest. The response to a training bout is characterized by t_n , the time necessary to recover initial performance after the training session, t_g , the time necessary to reach maximal performance, and p_g , the maximal gain in performance for 1 training unit.

could lift up to 210% of their body mass. Another study [11] demonstrated a 287% increase in the maximal amount of body weight that the animals could carry after 8 weeks of training (3 sessions a week).

RE model offers the opportunity to quantify both training work and performance in animal with a great accuracy. Thus, the twofold aim of the present study was to (i) test whether the systems models used to describe the training response in athletes could be applied in rats and (ii) verify the applicability of the mixed-effects model in animals with the same genetic background in order to improve the statistical strength of the training response model.

2. Methods

2.1. Animals and Experimental Design

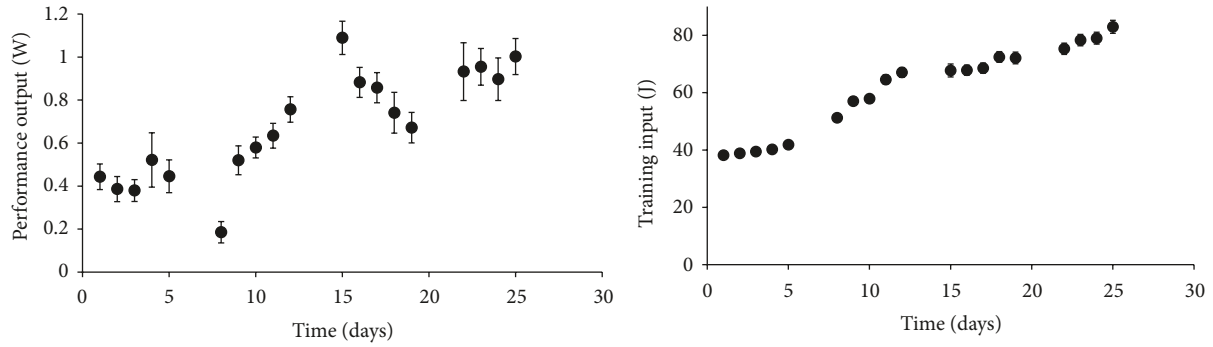


FIGURE 2: Quantification of training (systems input) and performance (systems output). Values are expressed in mean \pm SEM. Note that, for the training input, the variability is very low because the animals had the same age and the same training load calculated as a percentage of body mass. Thus, SEM bars are hardly visible.

2.1.1. Ethics Statement. This study was approved by the Committee on the Ethics of Animals Experiment of Languedoc Roussillon in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (permit number: CEEA-LR-1069).

2.1.2. Animal Model. Eight-week-old Wistar Han rats (277 ± 15 g; $n = 11$) obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, Rhône, France) were housed at a constant room temperature and humidity and maintained in a 12 : 12 h light-dark cycle. They had access to standard rat chow (A04, Scientific Animal Food & Engineering, Augy, France) and water *ad libitum*.

2.1.3. Resistance Training Protocol. The rats underwent 4 weeks of progressive resistance training. The exercise consisted of climbing a 1-meter-high homemade ladder inclined at 85° ten times. The ladder was adapted from the apparatus of Lee et al. [12]. Training sessions were held in the afternoon, five times a week. A cloth bag containing weights was attached to the base of the tail with tape. Three days before training, the rats were familiarized with the apparatus by climbing it twice with 50% of body weight. In accordance with the protocol proposed by Begue et al. [10], the initial weight attached to the tail was 50% of the rat body weight and was increased progressively until 150% after 4 weeks (Table 1). Each training session consisted in one set of 10 repetitions with 2 min rest between trials. All rats were able to perform ten climbs per training session. Rats from the same cage were trained together. Precisely, rats were placed on a platform on the top of the ladder and one of them was put on the floor at the base of the ladder. The working rat quickly joined its congeners spontaneously.

2.2. Training and Performance Quantification. Training work (TW in J) was calculated as the potential work developed during the training sessions:

$$TW = (m_{\text{load}} + m_{\text{rat}}) \cdot g \cdot \Delta h \cdot N, \quad (1)$$

where mass (m) is expressed in kg, g is the constant of the gravity on earth expressed in $\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$, h is the distance climbed in m, and N is the number of repetitions.

Performance was the power output developed during the full climbing session, computed as the work done against gravity (TW) divided by total climbing time (s) and expressed in W:

$$\text{Performance} = \frac{TW}{\text{time}}. \quad (2)$$

Each climb generally lasted between 3 and 25 s depending on the load carried by the rats.

2.3. Modeling of the Training Effects

2.3.1. Basic Frameworks. Since the original work of Banister and coworkers [1], systems modeling has been used to analyze the adaptations to physical training in subjects enrolled in controlled experiments or in athletes in real-life situations [13, 14]. This approach considers the body as a system whose output is the performance varying with the amounts of training ascribed to input. Systems theory allows the analysis of a dynamical process using abstraction from mathematical models. A system is characterized by at least one input and one output, and the system behavior is characterized by a transfer function $H(t, \theta)$ relating output at a given time to previous inputs. Assuming the formulation of the transfer function, the set of parameters characterizing a subject's behavior (noted θ) is estimated by fitting the model output to the actual data. The number of parameters which can be introduced in the model is limited by the precision of the data that can be collected to quantify training input and performance output. An analysis of the goodness-of-fit is needed to test the statistical significance of the model, especially to compare models differing in complexity, that is, the number of equations and related parameters giving the degrees of freedom of the competing models (df).

The transfer function $H(t, \theta)$ gives the model performance at time t by using the product of convolution as follows:

$$p(t) = p(0) + w(t) * H(t, \theta), \quad (3)$$

where $p(0)$ is the initial performance and the product of convolution is defined by

$$w(t) * H(t, \theta) = \int_0^t w(s) \cdot H(t-s, \theta) ds. \quad (4)$$

The discretization of (2) gives

$$p(n\Delta t) = p(0) + \sum_{i=1}^{n-1} w(i\Delta t) \cdot H((n-i)\Delta t, \theta), \quad (5)$$

where $t = n\Delta t$ and $w(0)$ is assumed to be equal to 0. Fixing the value of Δt to 1 day led us to consider $w(t)$ as a discrete function, that is, a series of impulses each day: w^i on day i , and the product of convolution as a summation in which the model performance \hat{p}^n on day n is estimated by mathematical recursion from the series of w^i before day n .

2.3.2. Systems Models. The most often used model initially proposed by Banister et al. [1] is named Model-2Comp in the present study (Figure 1). The system operates in accordance with a transfer function resulting from the difference between two components: one acting positively on performance ascribed to training adaptations and the second acting negatively on performance ascribed to the fatiguing effects of exercise. Responses to training are thus characterized by the set of model parameters including two gain-terms k_1 and k_2 and two time constants τ_1 and τ_2 . The equation of Model-2Comp is

$$\hat{p}^n = p(0) + k_1 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} w^i \cdot e^{-(n-i)/\tau_1} - k_2 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} w^i \cdot e^{-(n-i)/\tau_2}. \quad (6)$$

To assess the statistical significance of Model-2Comp, its goodness-of-fit was compared with that of a systems model comprising only one training component (Model-1Comp), whose equation is

$$\hat{p}^n = p(0) + k_1 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} w^i \cdot e^{-(n-i)/\tau_1}. \quad (7)$$

It was shown that the fitting of performance can be significantly improved with a model with k_2 varying over time in accordance with system input [3]. We tested this model, noted here as Model-3Comp, whose equation is

$$\begin{aligned} \hat{p}^n = p(0) + k_1 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} w^i \cdot e^{-(n-i)/\tau_1} \\ - \sum_{i=1}^{n-1} (k(0) - \Delta k_2^i) \cdot w^i \cdot e^{-(n-i)/\tau_2} \end{aligned} \quad (8)$$

in which the value of k_2 at day i is estimated by mathematical recursion using a first-order filter with a gain term k_3 and a time constant τ_3

$$\Delta k_2^i = k_3 \cdot \sum_{j=1}^i w^j \cdot e^{-(i-j)/\tau_3}. \quad (9)$$

We added the value of k_2 at time 0 in this study, noted $k_2(0)$.

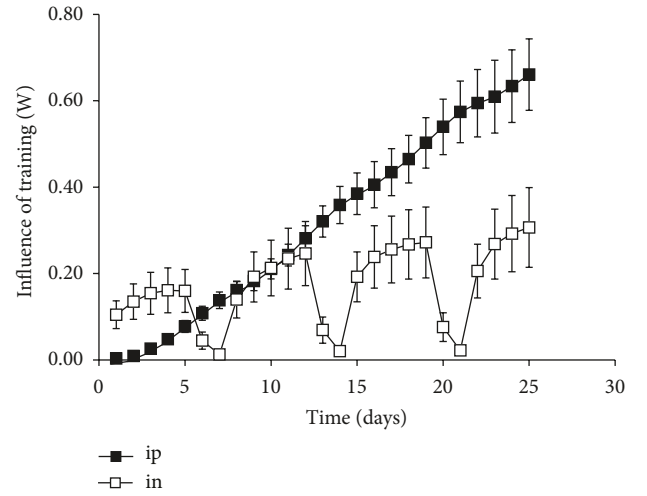


FIGURE 3: Mean \pm SEM of the sum of positive and negative influences of training on performance.

2.3.3. Estimation of Model Parameters and Statistics. The parameters for the models were determined by fitting the model performances to actual performances for the entire group of rats using a mixed-effects model. This model incorporated a systematic component for the mean response of the population and a random component for each animal's response around the mean. The general model included (i) common time constants: τ_1 for Model-1Comp, τ_1 and τ_2 for Model-2Comp, and τ_1 , τ_2 , and τ_3 for Model-3Comp; (ii) a subject-specific intercept $p(0)$; and (iii) subject-specific multiplying factors for each component: k_1 for Model-1Comp, k_1 and k_2 for Model-2Comp, and k_1 , $k_2(0)$, and k_3 for Model-3Comp. The set of model parameters was calculated to produce the equation that most closely fit the data points. Using the generalized reduced gradient (GRG) algorithm in the Excel solver, the parameters were determined by minimizing the residual sum of squares (RSS) between the modeled and measured performances given by

$$RSS = \sum_{r=1}^R \sum_{n=1}^N (p_r^n - \hat{p}_r^n)^2, \quad (10)$$

where r is an integer corresponding to each rat (total number R being 11) and n to each day during which performance was measured (total number being 19 for each rat). p_r^n is the actual performance and \hat{p}_r^n is the model performance at day n for rat r .

Indicators of goodness-of-fit were estimated for each model used in this study. The Shapiro-Wilk test was used to check the normality of the distribution of both the training loads, that is, input of the model, and the performances, that is, output of the model. The statistical significance of the fit was tested by analysis of variance of the RSS in accordance with the degrees of freedom (df) of each model: 12 for Model-1Comp, 24 for Model-2Comp, and 36 for Model-3Comp. The adjusted coefficient of determination ($\text{Adj}.R^2$) was computed to take into account the difference in df between the models. The mean square error on performance estimation (SE) was

computed as $RSS/(N - df - 1)$. The level of confidence for each level of model complexity was tested by analysis of variance of the related decrease in residual variation. The decrease in RSS explained by the introduction of further model parameters was tested using the F -ratio test in accordance with the increase in df as described previously [15]. Data in the text and Table 1 are expressed as means \pm SD and the responses to training are showed with SEM in Figures 2 and 3.

2.3.4. Modeled Responses to Training. With Model-2Comp, the time response of performance to a single training bout was characterized by t_n , the time to recover performance, and t_g , the time to peak performance after training completion [16], computed as

$$t_n = \frac{\tau_1 \tau_2}{\tau_1 - \tau_2} \ln \left(\frac{k_2}{k_1} \right), \quad t_g = \frac{\tau_1 \tau_2}{\tau_1 - \tau_2} \ln \left(\frac{\tau_1 k_2}{\tau_2 k_1} \right). \quad (11)$$

p_g , the maximal gain in performance for 1 unit of training, was estimated as

$$p_g = k_1 e^{-t_g/\tau_1} - k_2 e^{-t_g/\tau_2}. \quad (12)$$

To distinguish the short-term negative effect of the training doses from the long-term benefit, the positive and negative influences of training on performance (ip and in , resp.) were estimated as described previously [17]. The amount of training on day i had an effect on performance on day n quantified by

$$E\left(\frac{i}{n}\right) = k_1 w^i e^{-(n-i)/\tau_1} - k_2 w^i e^{-(n-i)/\tau_2}. \quad (13)$$

The values of in and ip on day n were estimated from the sum of influences of each past training amount, depending on whether the result was negative or positive:

$$\begin{aligned} in^n &= \sum_{i=1}^{n-1} \left| E\left(\frac{i}{n}\right) \right|, \quad \text{when } E\left(\frac{i}{n}\right) < 0 \\ ip^n &= \sum_{i=1}^{n-1} \left| E\left(\frac{i}{n}\right) \right|, \quad \text{when } E\left(\frac{i}{n}\right) > 0. \end{aligned} \quad (14)$$

3. Results

Figure 2 shows the evolution in training work and performance. Table 2 shows the statistics for the fitting of performance with the three tested models. Although the fit was statistically significant for all models, only Model-2Comp significantly improved the fit when compared with Model-1Comp ($P < 0.05$). The third component in Model-3Comp failed to give a description of performance variations compared with Model-1Comp and Model-2Comp ($P > 0.05$). It is noteworthy that the coefficient of determination adjusted to the model df was lower for Model-3Comp than for Model-2Comp.

Because of its statistical significance, the results from Model-2Comp were retained for the analysis of the effects of training. With the estimates of parameters of Model-2Comp

TABLE 2: Statistics of model fitting.

Model	R^2	Adj. R^2	F ratio	df	P	SE
Model-1Comp	0.48	0.45	14.97	12, 196	<0.001	0.209
Model-2Comp	0.53*	0.47	8.78	24, 184	<0.001	0.202
Model-3Comp	0.54	0.45	5.68	36, 172	<0.001	0.198

Model-1Comp, model using one first-order component; Model-2Comp, model using two first-order components; Model-3Comp, model with two components where the gain term for the negative component varies by using one further first-order filter. Adj. R^2 , adjusted coefficient of determination; df , degrees of freedom; SE, standard error. Statistical difference compared to Model-1Comp: * $P < 0.05$.

($\tau_1 = 5.31$ days, $\tau_2 = 4.3$ days, $k_1 = 0.0186 \pm 0.0134$, and $k_2 = 0.0200 \pm 0.0157 \text{ s}^{-1}$), the response to a training bout was characterized by $t_n = 1.07 \pm 1.46$ days, $t_g = 5.29 \pm 2.04$ days, and $p_g = 0.0011 \pm 0.0005$ W. The variations in ip and in are shown on Figure 3. ip , which can be regarded as an index of the adaptations to physical training, increased progressively all along the experiment, whereas in , the index of fatigue, increased during the first days of training each week before it plateaued with the daily sessions. The 2 days without training between weeks allowed a complete recovery of past sessions.

4. Discussion

In the present study, Model-2Comp was retained as the optimal model because statistically it provided the best description of the effect of the response to resistance training in rats. Contrary to the results in a previous report [3], Model-3Comp did not statistically improve the fit of the model, possibly because of an insufficient amount of training work. This model is based on the assumption that the relationship between daily training work and performance has an inverted-U shape, which implies that when the amount of training exceeds an optimal value of daily work, performance will decline because of the transient oversolicitation. The amounts of training in the present study may not have been great enough to allow the detection of such an effect. The variations in fatigue elicited by the exercise over the entire study period were relatively small and Model-3Comp did not increase the response to training compared to Model-2Comp. This is supported by the estimates for the small values obtained for t_n and t_g , which suggested that the rats coped well with the training work. Nevertheless, Model-3Comp is of a great interest for exercise prescription because it allows for more detailed analysis of the detrimental effects of training with heavy/supraoptimal loads. For this reason, this preliminary study with an experimental animal model provides a basis for further research using Model-3Comp. Indeed, to optimally capture the process of training, it will be necessary to increase the amount of training work and to use contrasted training programs with periods of more intensified training followed by reduced training work. Moreover, this systematic mathematical procedure of modeling offers the possibility of simulating training effects in order to test different strategies, and it may thus be useful for advocating individualized training programs, which constitute the optimal adaptive

stimulus. This type of approach was developed to optimize the training process in athletes [18, 19], but, with the animal as an experimental model, it could be extended to those chronic diseases for which exercise presents curative properties as already employed in cardiac rehabilitation [20, 21]. It would thus be of interest to extend these strategies of rehabilitation programs to rodent models suffering from other chronic diseases (e.g., ob/ob mice, db/db mice for type 2 diabetes, and the streptozotocin model for type 1 diabetes), as direct testing in patients would not be ethical.

Another advantage of the animal model compared with human modeling of training effects is the high precision in the quantification of training work and performance. In the present study, the training work was directly computed by the mechanical work of the center of mass [22]. Here, the unit was the joule, whereas the training load for athletes is indirectly evaluated by the variation in heart rate, as initially proposed by Banister, or the number of repetitions in each exercise bout [17, 23, 24]. The measure of performance is also more accurate because it is computed from the power developed according to the reference method of the center of mass [22]. This measure in each training session also allows the collection of a high number of performance values needed to fit the model.

This study is the first to blend the mixed-effects model in that proposed by Banister, that is, Model-2Comp. This advance in the technical sophistication of the modeling led us to pool the data of the entire group of animals which offers two main advantages over the classical single-individual model. The first advantage is that it provides great robustness in the determination of the model parameters and insofar it increases the number of performance criteria, without increasing the degrees of freedom of the model in the same proportion. The second advantage is that it offers the possibility of sacrificing several animals during training to gain information about the dynamics of the biological processes involved, without appreciably degrading the precision of the training response quantification. The only precaution that needs to be taken is to adapt the number of animals included in the study according to the number of biological measures planned at different times so that the training response at the end of the training period is still representative with regard to a sufficient sample size.

Last, compared with studies on training effects in athletes, the animal model offers optimal conditions to link both the positive and negative effects of training to the transitory adaptive mechanisms induced by the cell signaling pathways. Until now, the process of training adaptation was considered to be like a black box, wherein performance output is the response to training work. With an animal model that conforms to the standards for the ethical treatment of experimental animals, it is possible to give the real physiological signification to the components of the transfer function used to describe the training effects on performance. New hypotheses can thus be formulated to explain the positive and negative training effects on performance. For example, is the positive influence (ip) linked to the main protein synthesis-signaling pathway under the control of the mechanistic (or mammalian) target of rapamycin MTOR or is it related to the signaling scaffold

that is responsible for morphological adaptations (phenotype, ATPase activity, and hyperplasia)? On the other hand, can the negative influence (in) be explained by exercise-induced proteolysis, a phenomenon which seems to be attenuated at least in part by resistance training through attenuated induction of atrogenes, such as the muscle ring finger 1 (MuRF-1) [25]?

5. Conclusion

Modeling the effects of resistance training is fully applicable in rodent and allows for the detailed analysis of the training adaptation process. Model-2Comp was the most appropriate model to describe the training responses in the present study. The addition of contrasted periods to our training program may be promising for the application of Model-3Comp, which would yield information on the optimal value of daily training work, a major focus in research on individualized training and rehabilitation programs. The mixed-effects model offers two main advantages compared with individual classical modeling, with (i) greater robustness in the determination of the model parameters and (ii) the possibility to determine the kinetic of the biological parameters by sacrificing several animals at critical times during the training program. The accuracy in quantifying training loads and performance in the experimental condition of resistance training with rodents, as well as the possibility of tightly controlling external factors, makes it possible to upgrade the structure of the training effects model and establish the biological significance of the model components.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Thierry Busso and Robin Candau have equally contributed to this work.

Acknowledgments

The authors would like to thank Marie-Amélie Le Fur and Florence Sabatier and Sara Laatar for her precious help in training the animals and Catherine Carmeni for revising the English paper.

References

- [1] E. W. Banister, T. W. Calvert, M. V. Savage, and T. Bach, "A systems model of training for athletic performance," *Australian Journal of Sports Medicine*, vol. 7, pp. 57–61, 1975.
- [2] R. Candau, T. Busso, and J. R. Lacour, "Effects of training on iron status in cross-country skiers," *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, vol. 64, no. 6, pp. 497–502, 1992.

- [3] T. Busso, "Variable dose-response relationship between exercise training and performance," *Medicine and Science in Sports and Exercise*, vol. 35, no. 7, pp. 1188–1195, 2003.
- [4] H. de Jong and D. Ropers, "Strategies for dealing with incomplete information in the modeling of molecular interaction networks," *Briefings in Bioinformatics*, vol. 7, no. 4, pp. 354–363, 2006.
- [5] S. Girgis, S. M. Pai, I. G. Girgis, and V. K. Batra, "Pharmacodynamic parameter estimation: population size versus number of samples," *The AAPS Journal*, vol. 7, no. 2, pp. E461–E466, 2005.
- [6] K. Ogungbenro, A. Dokoumetzidis, and L. Aarons, "Application of optimal design methodologies in clinical pharmacology experiments," *Pharmaceutical Statistics*, vol. 8, no. 3, pp. 239–252, 2009.
- [7] M. Avalos, P. Hellard, and J.-C. Chatard, "Modeling the training-performance relationship using a mixed model in elite swimmers," *Medicine and Science in Sports and Exercise*, vol. 35, no. 5, pp. 838–846, 2003.
- [8] J. Cholewa, L. Guimarães-Ferreira, T. da Silva Teixeira et al., "Basic models modeling resistance training: an update for basic scientists interested in study skeletal muscle hypertrophy," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 229, no. 9, pp. 1148–1156, 2014.
- [9] N. D. Duncan, D. A. Williams, and G. S. Lynch, "Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training," *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, vol. 77, no. 4, pp. 372–378, 1998.
- [10] G. Begue, A. Douillard, O. Galbes et al., "Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, Article ID e57141, 2013.
- [11] T. A. Hornberger Jr. and R. P. Farrar, "Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat," *Canadian Journal of Applied Physiology*, vol. 29, no. 1, pp. 16–31, 2004.
- [12] S. Lee, E. R. Barton, H. L. Sweeney, and R. P. Farrar, "Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats," *Journal of Applied Physiology*, vol. 96, no. 3, pp. 1097–1104, 2004.
- [13] J. Borresen and M. Ian Lambert, "The quantification of training load, the training response and the effect on performance," *Sports Medicine*, vol. 39, no. 9, pp. 779–795, 2009.
- [14] T. Busso and L. Thomas, "Using mathematical modeling in training planning," *International Journal of Sports Physiology and Performance*, vol. 1, no. 4, pp. 400–405, 2006.
- [15] H. J. Motulsky and L. A. Ransnas, "Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review," *The FASEB Journal*, vol. 1, no. 5, pp. 365–374, 1987.
- [16] J. R. Fitz-Clarke, R. H. Morton, and E. W. Banister, "Optimizing athletic performance by influence curves," *Journal of Applied Physiology*, vol. 71, no. 3, pp. 1151–1158, 1991.
- [17] T. Busso, R. Candau, and J.-R. Lacour, "Fatigue and fitness modelled from the effects of training on performance," *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, vol. 69, no. 1, pp. 50–54, 1994.
- [18] R. H. Morton, "Modelling training and overtraining," *Journal of Sports Sciences*, vol. 15, no. 3, pp. 335–340, 1997.
- [19] L. Thomas and T. Busso, "A theoretical study of taper characteristics to optimize performance," *Medicine and Science in Sports and Exercise*, vol. 37, no. 9, pp. 1615–1621, 2005.
- [20] S. le Bris, B. Ledermann, R. Candau, J. M. Davy, P. Messner-Pellenc, and D. le Gallais, "Applying a systems model of training to a patient with coronary artery disease," *Medicine and Science in Sports and Exercise*, vol. 36, no. 6, pp. 942–948, 2004.
- [21] S. le Bris, B. Ledermann, N. Topin, P. Messner-Pellenc, and D. le Gallais, "A systems model of training for patients in phase 2 cardiac rehabilitation," *International Journal of Cardiology*, vol. 109, no. 2, pp. 257–263, 2006.
- [22] W. O. Fenn, "Work against gravity and work due to velocity changes in running," *The American Journal of Physiology*, vol. 93, pp. 433–462, 1930.
- [23] T. Busso, K. Häkkinen, A. Pakarinen et al., "A systems model of training responses and its relationship to hormonal responses in elite weight-lifters," *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, vol. 61, no. 1-2, pp. 48–54, 1990.
- [24] A. M. J. Sanchez, O. Galbès, F. Fabre-Guery et al., "Modelling training response in elite female gymnasts and optimal strategies of overload training and taper," *Journal of Sports Sciences*, vol. 31, no. 14, pp. 1510–1519, 2013.
- [25] H. Mascher, J. Tannerstedt, T. Brink-Elfegoun, B. Ekblom, T. Gustafsson, and E. Blomstrand, "Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle," *The American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 294, no. 1, pp. E43–E51, 2008.

Conclusion

Cette étude est à notre connaissance la première à appliquer la théorie des systèmes chez l'animal entraîné en résistance. Nous avons testé différents modèles à complexité croissante *i.e.* un modèle à simple fonction de transfert (2 degrés de liberté), le modèle de Banister à 2 fonctions de transfert (4 degrés de liberté) et le modèle à fatigue variable (5 degrés de liberté). L'analyse des gains de variance a montré que le modèle de Banister était le plus approprié pour décrire la performance à partir des charges d'entraînements ($r^2 = 0,53$; $p < 0,001$). L'évolution des influences positive et négative indique que les gains de performance sont dirigés essentiellement par une augmentation de l'influence positive. L'influence négative, qui augmente au cours des séances d'entraînement hebdomadaires, retrouve une valeur proche de 0 à la fin de chaque semaine (*i.e.* durant les 2 jours de repos du week-end). C'est probablement pour cette raison que le modèle à fatigue variable n'a pu améliorer la relation charge-performance. Les charges n'étant pas suffisamment importantes pour induire chez l'animal une fatigue durable, qui s'accumule au cours de la période d'entraînement. Ces résultats indiquent qu'un tel protocole d'entraînement, bien qu'intense, est parfaitement assimilé par les animaux. Ce type d'approche a été développé chez l'animal afin d'améliorer la compréhension des processus adaptatifs musculaires à l'origine des gains de performance observés à l'issue de la période d'entraînement. Il est maintenant possible d'étudier directement les adaptations musculaires par des techniques de laboratoire. C'est l'objectif de l'étude 3, présentée ci-après.

Etude 3 : La réponse musculaire à l'entraînement en **résistance s'exprime essentiellement par une** **plasticité de l'activité ATPasique de la myosine**

Article 3

Muscle plasticity in response to resistance training is mainly controlled by a
myosin ATPase adaptation

Manuscrit en préparation

Philippe AG, Lionne C, Pagano AF et Candau RB

- Présenté à la Journée de l'Ecole doctorale Sciences du Mouvement Humain, 29 mai 2015, Nice, France : Premier prix de communication orale.
- Présenté au 44th European Muscle Conference (EMC), 21-25 septembre 2015, Varsovie, Pologne (communication affichée).

Introduction

L'entraînement en résistance détermine des adaptations musculaires qui s'expriment à tous les niveaux d'étude du muscle strié squelettique et qui permettent une amélioration de l'efficacité musculaire à l'origine des gains de performance. A l'échelle macroscopique, ces adaptations d'ordre quantitatif sont bien connues. Elles sont principalement liées à une hypertrophie des fibres musculaires et à des changements phénotypiques (Baldwin & Haddad, 2001; Phillips, 2014). A l'échelle de la fibre, des adaptations d'ordre qualitatives déterminent également des gains de performance. La tension spécifique est améliorée sous l'effet de l'entraînement en résistance conférant à la fibre musculaire une plus grande force rapportée à sa surface de section (Harber *et al.*, 2004; D'Antona *et al.*, 2006). Le protocole d'entraînement en résistance selon un modèle d'escalade utilisé dans cette étude expérimentale est le même que pour l'étude précédente (*i.e.* étude 2), adapté au sein de mon laboratoire d'accueil (Begue *et al.*, 2013). Les résultats de l'étude conduite au laboratoire montrent d'une part un shift phénotypique en faveur des MHC2A en réponse à l'entraînement et d'autre part, une hypertrophie induite par la voie signalétique IL-6/STAT1/STAT3 (Begue *et al.*, 2013). Cependant, l'amplitude de ces adaptations d'ordre quantitatif est limitée comparé aux gains de force développés par les animaux. A l'issue des 10 semaines d'entraînement, l'hypertrophie atteignait toutes les isoformes exprimées au sein des fibres (MHC1, MHC2A, MHC2X) avec des augmentations de CSA de l'ordre de 100%, alors que les animaux avaient développé des gains de force de 350% lors du test de répétition maximal (Bègue, 2013). C'est dans ce contexte que l'étude 3 a été conduite. Si les adaptations d'ordre quantitatif ne permettent pas d'expliquer les gains de performance très marqués en réponse à l'entraînement, il doit exister des adaptations plus fines d'ordre qualitatif qui pourraient déterminer des gains de performance observés. Nous avons formulé l'hypothèse qu'une forme de plasticité pourrait intervenir au niveau de l'unité contractile. Une forme d'adaptation à l'échelle moléculaire était déjà suspectée par l'équipe de Bottinelli qui n'arrivait pas à expliquer la variabilité des propriétés contractiles et énergétiques des fibres musculaire par leur simple composition en isoforme de myosine (Canepari *et al.*, 2010). Bien que l'activité ATPasique soit supposée constante pour une isoforme de fibre donnée (Bottinelli *et al.*, 1994b), une étude précédente conduite au laboratoire a montré que l'activité ATPasique et la composition en isoforme de fibre étaient deux mécanismes qui pouvaient évoluer de manière

dissociée sous l'effet de l'entraînement en endurance et/ou en conditions hypoxiques (Roels *et al.*, 2008). Ces travaux suggèrent ainsi l'existence d'une adaptation de l'activité ATPasique indépendante des variations phénotypiques et viennent corroborer des observations similaires déjà évoquées (Schluter & Fitts, 1994).

Ces évidences expérimentales nous ont conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle une adaptation de l'activité ATPasique pourrait intervenir au sein du cycle mécano-chimique permettant ainsi d'expliquer les gains de performance observés en réponse à l'entraînement de résistance. Dans cette étude, nous avons sélectionné les muscles les plus impliqués dans l'activité d'escalade et identifié l'importance des muscles fléchisseurs des doigts, dont le FDP est le principal (Philippe *et al.*, 2012; Deyhle *et al.*, 2015), et des muscles principaux du membre supérieur que sont le biceps (principal fléchisseur du coude) et le deltoïde (principal muscle de la ceinture scapulaire).

Les résultats des expérimentations cinétiques réalisées à partir de myofibrilles en suspension montrent qu'en réponse à l'entraînement, (1) le cycle mécano-chimique est capable de majorer sa puissance chimique (activité ATPasique) et que (2) ces adaptations sont d'amplitudes similaires aux gains de puissance observés.

Muscle plasticity in response to resistance training is mainly controlled by a myosin ATPase adaptation

Antony G. PHILIPPE^{1,*}, Corinne LIONNE², Allan F. PAGANO¹ and Robin CANDAU^{1,*}

¹*Université de Montpellier, INRA, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, F-34060, Montpellier, France*

²*Centre d'Etudes d'Agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, FRE3689, CNRS, Montpellier, France*

*Correspondent. Email: antony.philippe@umontpellier.fr; robin.candau@umontpellier.fr

Key words: myofibril, training effect, ATPase activity, climbing, performance

Introduction

Skeletal muscle shows a remarkable malleability in functional adaptation and remodeling in response to different stimulations [1]. The classical theory predicts that contractile and energetic properties depend on the myosin heavy chain (MHC) isoforms content that is primarily responsible for myosin ATPase activity (m-ATPase), speed and power of contraction [2]. Unloaded shortening velocity and m-ATPase activity are lower in slow-twitch fibres (MHC1) compared to fast-twitch fibres (MHC2) especially at low temperatures [3–6]. However, several experimental evidences seem to challenge the classical theory. Muscular adaptations seem to occur in the contractile unit itself in response to training, independently from MHC isoform composition, changing the fibre contractile and energetic properties. An increase in the unloading shortening velocity has been shown in both MHC1 and MHC2A fibres, after a period of resistance training (RT) in old men [7]. The specific tension is also affected by resistance exercise. D'Antona et al. [8] have shown an higher specific tension in both MHC2A and MHC2X of *vastus lateralis* muscle of body-builders performing hypertrophic heavy resistance exercise compared to controls. Moreover, two separated studies have evidenced an augmentation of m-ATPase activity after endurance training in rats by 23 % [9] and 24 % [10] independent of MHC composition changes. This increase was associated to a diminution of 19% of the unloading shortening phase duration suggesting an increase in the shortening velocity with training, for a given fibre type [10]. This increase in shortening velocity was confirmed in MHC2A in *vastus lateralis* of resistance trained men [11].

Among stimulations, RT is known to induce marked adaptations in skeletal muscle. One of the first adaptations induced by RT, is the increase of the maximal voluntary contraction force. For instance, maximal voluntary contraction force increased by 35% after 9 RT sessions spread on 3 weeks [12]. Muscle plasticity is also expressed through fibre hypertrophy with often a greater response in fast-twitch fibres [13]. RT induces also changes in fibre type composition. Several studies have shown an increase in the MHC2A proportion associated to a diminution of MHC1 and MHC2X in both rats [14,15] and humans [11,16]. Moreover, these shifts can occur as soon as the second week of training [17]. In addition, in a recent study, we have shown that RT consisting in ladder climbing could be associated with marked performance gain with an increase in power output of 129% after 4 weeks of training [18]. Since enhancement of performance due to RT is greater than the magnitude of the increase of the fibre cross sectional area, the tension

developed and the phenotypical changes, we suspected qualitative adaptations within the fibre itself. We hypothesized marked adaptations in m-ATPase activity independent to the phenotype shift in response to RT.

Results

RT induces a moderate hypertrophy but marked strength and power output gains

In the present study, we replicated the training protocol of Begue and collaborators [14]. It consists in progressive RT program, based on a climbing voluntary exercise. After the 4-wk of RT, the body mass increased in both groups and there was no significant difference between the control group (CG) and the resistance-trained group (TG; Fig. 1a). Hypertrophy was defined by the increase of the relative muscle mass and determined by the muscle mass/body mass ratio. Here, data has shown an increase of the relative muscle mass for deltoid and *Flexor Digitorum Profundus* (FDP) with an augmentation of 22.6% and 31.2% respectively compared with CG (Fig. 1b). No significant difference was evidenced for the biceps after training. To evaluate strength gain, all animals were asked to perform a climbing boot with maximal load. Strength was increased by 137% in TG compared to CG (Fig. 1c). CG and TG could raise $116.6 \pm 8.6\%$ and $276.7 \pm 8.4\%$ of their body mass, respectively. To evaluate the mechanical power output gain developed against gravity between the beginning and the end of RT, the potential work was divided by the time of climbing. Mechanical power output was increased by 135.7% at the end of the training period. Rats developed 0.55 ± 0.18 W vs. 1.27 ± 0.47 W at the first and the last day of training, respectively (Fig. 1d).

Time course of m-ATPase is triphasic

M-ATPase activity in fully calcium-activated condition was followed over 5 s by Rapid Quench Flow method and the ADP production over time was measured by HPLC. The effect of training on the m-ATPase activity and the three characteristic phases described by Lionne et al. [19] could be identified (Fig. 2a): (1) a fast mono-exponential phase corresponding to a ADP burst phase of rate constant k_{OBS} , (2) a rapid steady-state of slope k_F , corresponding to the m-ATPase activity

during contraction at maximal velocity, and (3) a slow steady state of slope k_S , corresponding to the m-ATPase activity during over-contraction of myofibrils. Several series of independent repetitions were performed for each muscle and condition, and ATPase activities were consistent among repetitions (Figs. 2b, 2c, 2d).

RT increases the rate constant of the initial ADP burst phase of m-ATPase

Since the rate constant k_{OBS} of the ADP burst allows the characterization of the initial steps of the cross-bridge cycle, we analyzed the effect of RT on this parameter. k_{OBS} was significantly affected by RT and increased by 30% and 44% for biceps and FDP, respectively, in TG compared to CG; but did not increase in deltoid (Fig. 3a).

RT induces a marked increase of the fast steady-state rate constant of m-ATPase

The analysis of the fast steady-state phase evidenced a main effect of training on m-ATPase activity. k_F was significantly higher in TG compared to CG for the three muscles studied (Fig. 3b). In biceps, k_F was increased by 42% ($0.91 \pm 0.13 \text{ s}^{-1}$ and $1.29 \pm 0.19 \text{ s}^{-1}$ for CG and TG, respectively). In deltoid, k_F was increased by 84% with training ($1.10 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$ and $2.02 \pm 0.15 \text{ s}^{-1}$ for CG and CT), and in FDP, k_F was increased by 242% ($0.38 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$ and $1.32 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$ in CG and CT). Thus, RT induced a mean increase of 123% in the fast steady-state phase of m-ATPase for the three main muscles known to be involved during climbing (MacLeod et philippe 2012).

Effects of resistance training on the slow steady-state of m-ATPase

The rate constant k_S was significantly increased in both biceps and deltoid with an increase of 65% and 242% respectively (Fig. 3c). This increase was not further investigated in this study, since it is related to a non physiological phase during which myofibrils are over-contracting in pseudo-isometric conditions.

RT induces a shift toward an intermediate phenotype

To investigate the training effect on fibre type composition, MHC isoform were quantified by RT-qPCR. Since fibre type composition is traditionally analyzed by electrophoresis or

immunochemistry, we compared our result to that obtained by Delp and Duan [20] for biceps and deltoid, and by Begue et al. for FDP [14] using immunochemistry method (R^2 were 0.69, 0.95 and 0.99 for biceps, deltoid and FDP, respectively). As shown in Fig. 4, after four weeks of RT, the proportion of MHC2A increased by 230% and 60% for biceps and FDP, respectively. In the same muscles, the proportion of MHC2X decreased by 92% and 39%, respectively. RT did not affect the deltoid MHC composition. These data confirm the shift from a fast to an intermediate phenotype induced by RT in both biceps and FDP. This shift could not explain the force and power output gains.

MHC2A and MHC2B ATPase activity increases after RT

We have shown that RT induced an augmentation of m-ATPase activity (*i.e.* k_F) in the three muscles studied. One could argue that this observation is due to the changes in MHC isoform proportions since ATPase activity is specific for each isoform [3,6]. To test this potential explanation, we expressed the percentage of MHC2A and MHC2B (expressed in percentage of MHC total) in function of m-ATPase activity represented by k_F for CG and TG. A correlation was evidenced between k_F and MHC2A proportion in both CG and TG (Fig. 5a). The difference in y-intercept between CG and TG indicates a significant effect of training on k_F for a given proportion of MHC2A. Note that k_F is inversely proportional to the percentage of MHC2A since MHC2A are slower than MHC2B, especially at 4°C [6]. Thus, an increase of MHC2A proportion induces a reduction of k_F . In the same way in both CG and TG, a correlation between k_F and percentage of MHC2B proportion was observed (Fig. 5b). The difference in y-intercept between CG and TG indicates a significant effect of training on k_F for a given proportion of MHC2B. These results indicate that for a given MHC isoform, m-ATPase activity is increased with training. Based on the assumption that each MHC is associated to a specific value of k_F in CG, the simple mathematical model described in the method section allowed us to estimate the magnitude of the training effect (TE). Indeed, TE increased k_F by 110% whatever the considered myosin isoform (Fig. 5c).

The rate-limiting step of the cross-bridge cycle is accelerated after RT

A simple scheme of the cross-bridge cycle applied on the fast kinetics of ADP production (Fig.

6a) allowed us to identify the main molecular adaptations that drive the m-ATPase activity gain. Two rate constants among the fundamental steps of the cross-bridge cycle were increased upon RT. ATP hydrolysis rate constant was significantly accelerated by 30%, 47% and 95% in biceps, deltoid and FDP, respectively (Fig. 6c, d). Moreover, the rate-limiting step of product release was accelerated by 164%, 40% and 37% for the FDP, biceps and deltoid, respectively (Fig. 6e). No effect of training was observed on the binding step of ATP on the actin-myosin complex (Fig. 6b). These results suggest that the main adaptation to RT is held by the m-ATPase activity plasticity itself that occurs precisely during the step of the main myosin head isomerization (*i.e.* powerstroke) and liberation of the hydrolysis products, and to a lesser extent, during ATP hydrolysis step.

Discussion

The most important finding in the present study is that the mechanical power output gain of 136% in response of 4 weeks by progressive RT relies on the extremely marked adaptation of the m-ATPase activity. Indeed RT induces a mean 123% gain in m-ATPase activity in the three main muscles involved in climbing.

The plasticity of m-ATPase was only suspected until now and this study is the first to show unambiguously that the muscular plasticity rests largely on the adaptive capacity of the m-ATPase itself. This kind of adaptation at the level of the contractile unit has already been reported, but in a more discrete extend. In a previous study, we have evidenced that k_F decreased by 19% in hypoxic condition and increased by 24% after 5-weeks of endurance exercise in rat [10]. Similar result in endurance exercise were obtained by Schuler and Fitts who observed an increase of m-ATPase activity in MHC1 by 23% [9]. Bottinelli and colleagues have evidenced an increase of the sliding velocity with training in MHC2A [11]. This result suggests an adaptation of the m-ATPase activity since the speed of shortening is proportional to m-ATPase activity [21]. Moreover a slower sliding velocity of actin on myosin for MHC1 in *vastus lateralis* of body builder in *in vitro* motility assays associated to the concomitant slower maximum shortening velocity in fibres has been reported compared to controls [8]. In an opposite way, immobilization and/or ageing are associated to a reduction of the shortening velocity and m-ATPase activity, due to a glycation of the MHC that alter myosin function and muscle contractile properties [22–25].

In addition, a slower sliding velocity in both MHC1 and MHC2A in *vastus lateralis* were observed in elderly subjects (72.7 ± 2.3 years) compared to young subjects (30.2 ± 2.2 years) [26]. All together, these results indicate that skeletal muscle plasticity could be expressed within the contractile unit and molecular motor themselves. The present study has the merit to show that the major part of skeletal muscle plasticity and performance variations in terms of power output is due to an increase in power consumed and developed at the level of myosin heads. Molecular motors seem endowed with a surprising plasticity.

Here, we have shown that adaptations of the cross-bridge cycle, responsible of the enhancement of the m-ATPase activity, come mainly from an acceleration of the main myosin head isomerization step. During this step, the powerstroke occurs and the products of ATP hydrolysis (*i.e.* ADP and Pi) are released. Nevertheless, the precise mechanism that enhances this fundamental step is still to identify. Potential adaptations of myosin light chain for an explanation of the m-ATPase activity gains have been ruled out in previous studies in young adults [27] and old subjects [26,28].

The larger gain of m-ATPase activity in FDP (2.4-fold increase) compared to the two other studied muscles is in agreement with the notion that FDP as the set of finger flexor muscles represents the limiting factor in climbing performance based on muscle oxygenation technique with near infra-red spectroscopy [29,30].

The present study demonstrates that a climbing resistance exercise model on rat induced adaptations in m-ATPase activity (*i.e.* k_F) 2- to 12-fold larger than endurance training, depending on whether the muscles studied.

In conclusion, this study leads to a modulation of the classical theory that presents the plasticity of skeletal muscle as essentially controlled by a modification of the MHC isoform proportions and an adaptation of the fibres size. In addition to these quantitative changes, our results reveal that large adaptive qualitative process could occur in the contractile unit itself and explain a large part of performance gain. The increase (+135.7%) in mechanical power output elicited by resistance training is essentially dependent on the adaptations of the chemical power directly developed by m-ATPase (+123%) that occurs principally during the fundamental step of products of ATP hydrolysis liberation.

Material and Methods

Ethic statement

This study was approved by the Committee on the Ethics of Animals Experiment of the Languedoc Roussillon in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (Permit Number: CEEA-LR-1069). This study is in adherence to the animal care standards. All efforts were made to minimize suffering.

Animals

Eight-week-old Wistar han rats (233 ± 11 g), obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, Rhône, France) were randomly assigned into one of the two following groups: control (CG, $n = 10$) or resistance trained (TG, $n = 10$). Rats were housed at a constant room temperature and humidity and maintained at a 12:12 h light-dark cycle. They had access to standard rat chow and water *ad libidum*.

Resistance training protocol and performance quantification

After three days of adaptation, TG was trained during four-weeks of progressive resistance training. The exercise consisted in climbing ten times a homemade ladder inclined at 85° . The experimental condition was adapted from Lee et al. apparatus [31]. Training was performed at a constant hour during the afternoon. Cloth bag containing weights were attached to the base of the tail with a velcro strap. According to the Begue et al. protocol [14], the initial weight attached to the tail was 50% of the rat body weight and was increased by 10% every two days only for the rats that were able to perform the ten climbs per set. After two weeks of training, the weight reached 120% of the body weight and 150% after four weeks of training. Between each trial, the animals had a two min rest. The last day of training, all rats performed a maximal repetition test. The initial added weight were 80% and 200% of body weight for control and trained rats, respectively, and then increased by 10% of body weight if the rat was able to climb. Rats had 5 min rest between each trial. The test was stopped when the rat failed or refused to climb. Performance (in W) was measured for 7 rats during the first and the last training sessions. Performance was defined by the power output developed during the full climbing session and

computed as the training work (TW in J) divided by the time of climb (in sec):

$$TW = (m_{\text{load}} + m_{\text{rat}}) \cdot g \cdot \Delta h \cdot N$$

Where mass (m) is expressed in kg, g is the constant of the gravity on earth expressed in $\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$, h is the distance climbed in m, and N is the number of repetitions. Each climb lasted between 3 and 25 seconds depending on the load carried by the rats.

Myofibril preparation

Rats were killed two days after the end of the training program by a lethal intraperitoneal injection of pentobarbital $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Penthotal[®]). After sacrifice, rats were weighed and placed 24h flat on their stomach at 4°C . Forelegs were placed in standardized position and spaced each other by 10.5 cm and aligned with the head. *Flexor Digitorum Profundus* (FDP), *biceps brachii* (biceps) and deltoid were dissected because of their involvement in the climbing activity [29,30,32] Because fast kinetics of myosin ATPase required a relative large amount of biological material, the muscles were carefully collected and distributed for the main measurements. In each animal, a part of each muscle was immediately frozen in liquid nitrogen for further RT-qPCR analysis, and the rest of the muscles was immediately placed in a storage buffer at 4°C (composition in mM: 50 Tris-acetate pH 7.4, 100 K-acetate, 5 KCl, 2 Mg-acetate, 2 DTT, 0.2 PMSF, 0.01 leupeptin, 0.005 pepstatin, 0.5 Na-azide). Then, muscles were cut in pieces and crushed in a homogenization buffer (composition in mM: 50 Tris-acetate pH 7.4, 100 K-acetate, 5 KCl, 5 EDTA, 2 DTT, 0.2 PMSF, 0.01 leupeptin, 0.005 pepstatin, 0.5 Na-azide, and 0.5% triton X-100) with an ultra-turrax (Ultra Turrax[®] TP18-10, Ika) at 20000 rpm during three sessions of ten seconds. Homogenates were centrifuged three times at 1350 g for ten minutes at 4°C with resuspension of the pellet between each centrifugation. Then, the pellets were resuspended in storage and centrifuged three times at 1350 g for ten minutes at 4°C . The blend obtained can be stored up to four days at 4°C .

The day of the experiment, the myofibrils were washed in kinetic- Ca^{++} buffer (composition in mM : 50 Tris-acetate pH 7.4, 100 K-acetate, 5 KCl, 0.1 CaCl_2 , 2 Mg-acetate) and centrifuged three times at 1000 g for ten minutes at 4°C . Immediately before experimentation with myofibrils, any aggregates were removed by filtration through a polypropylene filter of $149 \mu\text{m}$ pore openings (Spectra Mesh, Spectrum Medical industries, Inc., Laguna Hills, CA). The total

myosin head concentration in the myofibrillar suspension was measured by absorbance at 280 nm (UVmc² spectrophotometer, Safas, Monaco) of a 1/10 dilution of the suspension in 2% SDS [33].

Myofibrillar ATPase activity

ATPase measurements were carried out in a thermostatically controlled, Quench Flow apparatus (QFM-400, Bio-Logic SAS, Claix, France). Quench-Flow is a point-by-point method in which reaction mixtures are quenched at different times t and analyzed. Experiments were performed at 4°C to slow down the unloaded shortening velocity and thus, increase the duration of the unloaded shortening phase (t_b) in order to increase temporal resolution and characterize initial fast kinetics with precision. This chosen temperature of 4°C does not affect the myofibrils behavior and allows the assessment of the rate constant of the cleavage step in the cross-bridge cycle as validated by Stehle and collaborators [34]. Here, myofibrils were mixed with ATP (3 μ M myosin heads and 200 μ M ATP in reaction mixture) and quenched in acid (10% perchloric acid) at different times from 6 ms to 5 s. The kinetics included 43 points. Then, vials containing the acid quenched reaction mixture were clarified by centrifugation and the supernatant was adjusted to pH 5.5 with NaOH. ATP and ADP concentrations, reflecting the m-ATPase activity were assayed by HPLC (Alliance, Waters SAS) on an anion-exchange column (SAX-Partisphere, AIT France) at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was 200 mM (NH₄)₂HPO₄-HCl pH 5.5, 10% acetonitrile). The areas of the absorbance peaks of ADP and ATP at 259 nm were analyzed with the EmPower software (Waters SAS) that allows calculating the nucleotide concentrations (adapted from Lallemand et al. 2012, FEBS Lett. 586, 4223-4227). Note that the PCA used to quench the reaction dissociates all complexes. Therefore nucleotide concentrations measured correspond to total nucleotide concentrations (i.e., myosin-bound plus free ADP or ATP) that were present in the reaction mixture, at the time of quenching.

Modeling of the chemical kinetics

The whole time course of ATP hydrolysis was modeled with a three-component model, one exponential (ADP-burst) and two linear (steady-state) in order to determine kinetics parameters:

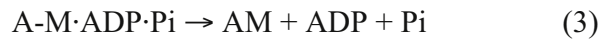
$$[\text{Total ADP}]/[\text{myosin head}] = A \cdot [1 - \exp(-k_{\text{OBS}} \cdot t)] + k_F \cdot t + U \cdot [A + k_F \cdot t_B + k_S \cdot (t - t_B)]$$

where $[\text{Total ADP}]/[\text{myosin head}]$ is the amount of total ADP produced per myosin head (mol of

ATP hydrolyzed/mol of myosin head), A and k_{obs} are the amplitude (mol/mol) and the rate constant (s^{-1}) of the ADP burst, respectively, k_F is the rate constant (s^{-1}) of the steady-state during unloading shortening phase, k_S is the rate constant (s^{-1}) of the steady-state during overcontraction, t_B is the time break (s) corresponding to the unloading shortening phase duration, $U = 0$, when $t < t_B$ and $U = 1$, when $t > t_B$. In other terms, the third component starts at the offset of the first fast linear phase. The model parameters were determined using an iterative process that minimizes the sum of the mean squares between the total ADP measured and that predicted by the model.

Modeling of the cross-bridge cycle

To identify the fundamental steps of the cross-bridge cycle that support adaptations to training, a simplified scheme was retained. Since collision and diffusion steps of the cross-bridge cycle are very fast, the cross-bridge cycle was resumed to the three slower steps that include an isomerization and control the kinetic of the cycle:



Where AM is the actin-myosin complex in strong interaction and $A-M$ in weak interaction or dissociated complex. Step (1) represents the ATP binding that induces myosin detachment from actin. Step (2) represents the ATP hydrolysis step. Step (3) includes the powerstroke and the release of the hydrolysis products, Pi and ADP . In our simple scheme, (1) is driven by ATP concentration and k_1 rate constant, (2) by k_2 (forward) and k_{-2} (reverse) rate constants, and (3) by k_3 rate constant. Time course of ADP production obtained by rapid flow quench were fitted until t_B with this simple scheme of cross-bridge cycle in Berkeley Madonna software (Robert I. Macey and George F. Oster, University of California).

Estimation of the training effect on m-ATPase activity

The m-ATPase activity was modeled as follow in order to estimate the training effect (TE):

$$k_{Fmod} = (k_F MHC1 * \%MHC1 + k_F MHC2A * \%MHC2A + k_F MHC2B * \%MHC2B + k_F MHC2X * \%MHC2X) * TE$$

where $k_{F\text{mod}}$ is the k_F model prediction and $k_{F\text{MHC}i}$ is the specific k_F for each MHC isoform. $k_{F\text{MHC}i}$ and TE were determined using an iterative process by minimizing the residual sum of squares (RSS) between the modeled and the measured k_F :

$$\text{RSS} = \sum_{m=1}^M \sum_{n=1}^N (k_F - k_{F\text{mod}})^2$$

Where m is an integer corresponding to each muscle (total number M being 3) and n taking the N values corresponding to the each condition (total number being 2 for control and resistance trained).

Myosin isoform determination

Muscle samples (*i.e.* FDP, biceps and deltoid) stored in liquid nitrogen were crushed in a tissue grind pestle (Kimble Chase, New Jersey, USA) and total RNA was extracted by using RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined by spectrophotometric analysis, and integrity was checked by $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ absorption ratio (> 1.80) and by agarose gel analysis. Total RNAs were stored at -80°C until further use. Reverse transcription reaction was performed with 1 μg of total RNA using RevertAid First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, France). First-strand cDNA synthesis was made by using 200 U of SuperScript II Reverse Transcriptase and Oligo(dT) 12–18 primers (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNAs were diluted (1:10) in water and stored at -20°C until further use. qPCR analysis was performed in a MiniOpticon detection system (Biorad, Hercules, CA) with 10 μL of KAPA SYBR Fast Universal Readymix (Thermo Scientific), 300 nM of both forward and reverse primers, 2 μL of diluted cDNA template and water to a final volume of 20 μL . The primers were designed using Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche Applied System) and RT Primer Data Base. Primer sequences are given in table 1. All PCRs were performed in duplicate using the following cycle parameters: 30 s at 98°C , 40 cycles of 1 s at 95°C and 15 s at 60°C . For each RT-qPCR reaction, Ct and priming efficiencies (E) were calculated using the LinRegPCR software [35,36]. MHC mRNA composition was calculated using the GeneFam approach, developed by Ellefsen and Stenslokken [37]. GeneFam provides a normalization-free alternative to reference gene-based normalization by treating individual genes as constituting fractions of collective Gene-

family expression:

$$\frac{100(\text{Gene}_x^{\text{E}^{\text{Ct}}})^{-1}}{(\text{Gene}_1^{\text{E}^{\text{Ct}}})^{-1} + (\text{Gene}_2^{\text{E}^{\text{Ct}}})^{-1} + \dots + (\text{Gene}_n^{\text{E}^{\text{Ct}}})^{-1}}$$

= Gene_x in percentage of total gene family expression

E = reaction efficiency and Ct = cycle threshold.

Statistical analysis

The two conditions of the use of parametric tests were tested. Distributions normality was checked with the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variance was checked with the F-test. Since studied variables displayed a normal distribution and a similar variance among groups, effects were analyzed by means of two-ways ANOVA. The two factors were exercise activity (control vs. resistance-trained) and muscle (biceps, deltoid and FDP). In case of a significant interaction effect, Tukey post-hoc tests were used to localize the difference. In order to only compare two means, the parametric t-test of student was used after checking the two conditions of application of parametric tests. Otherwise, the analysis was performed by the non-parametric test of Mann-Whitney. Correlation were performed to compare m-ATPase activity for a given MHC isoform between control and resistance trained conditions. Differences in y-intercept and slope of the relationship were then tested by ANCOVA. Analyses were performed on GraphPad Prism software (Prism 6, GraphPad software, La Jolla, CA). Level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

The authors would like to thank G. Begue and G. Py for their advice concerning resistance training protocol, S. Lataar and F. Sabatier for their precious help in training the animal. This project was supported by the Faculty of Sport Science of the University of Montpellier, the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

REFERENCES

1. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.* 2013 Feb 5;17(2):162–84.
2. Canepari M, Pellegrino MA, D'Antona G, Bottinelli R. Skeletal muscle fibre diversity and the underlying mechanisms. *Acta Physiol Oxf Engl.* 2010 Aug;199(4):465–76.
3. Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen GJ. Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J Physiol.* 1994 Dec 15;481 (Pt 3):663–75.
4. Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C. Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 1994 Jul 15;478 (Pt 2):341–9.
5. He ZH, Bottinelli R, Pellegrino MA, Ferenczi MA, Reggiani C. ATP consumption and efficiency of human single muscle fibers with different myosin isoform composition. *Biophys J.* 2000 Aug;79(2):945–61.
6. Candau R, Iorga B, Travers F, Barman T, Lionne C. At physiological temperatures the ATPase rates of shortening soleus and psoas myofibrils are similar. *Biophys J.* 2003 Nov;85(5):3132–41.
7. Trappe S, Williamson D, Godard M, Porter D, Rowden G, Costill D. Effect of resistance training on single muscle fiber contractile function in older men. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2000 Jul;89(1):143–52.
8. D'Antona G, Lanfranconi F, Pellegrino MA, Brocca L, Adami R, Rossi R, et al. Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibres in male body builders. *J Physiol.* 2006 Feb 1;570(Pt 3):611–27.
9. Schluter JM, Fitts RH. Shortening velocity and ATPase activity of rat skeletal muscle fibers: effects of endurance exercise training. *Am J Physiol.* 1994 Jun;266(6 Pt 1):C1699–1673.
10. Roels B, Reggiani C, Reboul C, Lionne C, Iorga B, Obert P, et al. Paradoxical effects of endurance training and chronic hypoxia on myofibrillar ATPase activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Jun;294(6):R1911–8.
11. Canepari M, Rossi R, Pellegrino MA, Orrell RW, Cobbold M, Harridge S, et al. Effects of resistance training on myosin function studied by the in vitro motility assay in young and older men. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2005 Jun;98(6):2390–5.
12. Pucci AR, Griffin L, Cafarelli E. Maximal motor unit firing rates during isometric resistance training in men. *Exp Physiol.* 2006 Jan;91(1):171–8.

13. Widrick JJ, Stelzer JE, Shoepe TC, Garner DP. Functional properties of human muscle fibers after short-term resistance exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Aug;283(2):R408–16.
14. Begue G, Douillard A, Galbes O, Rossano B, Vernus B, Candau R, et al. Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy. *PloS One*. 2013;8(2):e57141.
15. De Souza RWA, Aguiar AF, Carani FR, Campos GER, Padovani CR, Silva MDP. High-intensity resistance training with insufficient recovery time between bouts induce atrophy and alterations in myosin heavy chain content in rat skeletal muscle. *Anat Rec Hoboken NJ* 2007. 2011 Aug;294(8):1393–400.
16. Andersen LL, Andersen JL, Magnusson SP, Suetta C, Madsen JL, Christensen LR, et al. Changes in the human muscle force-velocity relationship in response to resistance training and subsequent detraining. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2005 Jul;99(1):87–94.
17. Staron RS, Karapondo DL, Kraemer WJ, Fry AC, Gordon SE, Falkel JE, et al. Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1994 Mar;76(3):1247–55.
18. Philippe AG, Py G, Favier FB, Sanchez AMJ, Bonnieu A, Busso T, et al. Modeling the responses to resistance training in an animal experiment study. *BioMed Res Int*. 2015;2015:914860.
19. Lienne C, Travers F, Barman T. Mechanochemical coupling in muscle: attempts to measure simultaneously shortening and ATPase rates in myofibrils. *Biophys J*. 1996 Feb;70(2):887–95.
20. Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1996 Jan;80(1):261–70.
21. Bárány M. ATPase Activity of Myosin Correlated with Speed of Muscle Shortening. *J Gen Physiol*. 1967 Jul 1;50(6):197–218.
22. Syrový I, Hodný Z. Non-enzymatic glycosylation of myosin: effects of diabetes and ageing. *Gen Physiol Biophys*. 1992 Jun;11(3):301–7.
23. Patterson MF, Stephenson DG, Kemp JG, Stephenson GM. Ca²⁺-activation characteristics of single fibres from chemically skinned rat muscle incubated with glucose-6-phosphate. *Pflug Arch Eur J Physiol*. 2000 Apr;439(6):845–52.
24. Höök P, Sriramoju V, Larsson L. Effects of aging on actin sliding speed on myosin from single skeletal muscle cells of mice, rats, and humans. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Apr;280(4):C782–8.

25. Ramamurthy B, Höök P, Jones AD, Larsson L. Changes in myosin structure and function in response to glycation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2001 Nov;15(13):2415–22.
26. D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, Rossi R, Carlizzi CN, Canepari M, et al. The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 2003 Oct 15;552(Pt 2):499–511.
27. Larsson L, Moss RL. Maximum velocity of shortening in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscles. *J Physiol.* 1993 Dec;472:595–614.
28. Larsson L, Li X, Frontera WR. Effects of aging on shortening velocity and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 1997 Feb 1;272(2):C638–49.
29. MacLeod D, Sutherland DL, Buntin L, Whitaker A, Aitchison T, Watt I, et al. Physiological determinants of climbing-specific finger endurance and sport rock climbing performance. *J Sports Sci.* 2007 Oct;25(12):1433–43.
30. Philippe M, Wegst D, Müller T, Raschner C, Burtscher M. Climbing-specific finger flexor performance and forearm muscle oxygenation in elite male and female sport climbers. *Eur J Appl Physiol.* 2012 Aug;112(8):2839–47.
31. Lee S, Barton ER, Sweeney HL, Farrar RP. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2004 Mar;96(3):1097–104.
32. Deyhle MR, Hsu H-S, Fairfield TJ, Cadez-Schmidt TL, Gurney BA, Mermier CM. Relative Importance of Four Muscle Groups for Indoor Rock Climbing Performance. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc.* 2015 Jul;29(7):2006–14.
33. Houadjeto M, Travers F, Barman T. Ca(2+)-activated myofibrillar ATPase: transient kinetics and the titration of its active sites. *Biochemistry (Mosc).* 1992 Feb 11;31(5):1564–9.
34. Stehle R, Lionne C, Travers F, Barman T. Kinetics of the initial steps of rabbit psoas myofibrillar ATPases studied by tryptophan and pyrene fluorescence stopped-flow and rapid flow-quench. Evidence that cross-bridge detachment is slower than ATP binding. *Biochemistry (Mosc).* 2000 Jun 27;39(25):7508–20.
35. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 2003 Mar 13;339(1):62–6.
36. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR

data. *Nucleic Acids Res.* 2009 Apr;37(6):e45.

37. Ellefsen S, Stensløkken K-O. Gene-family profiling: a normalization-free real-time RT-PCR approach with increased physiological resolution. *Physiol Genomics.* 2010 Jun;42(1):1–4.

FIGURES AND LEGEND

Figure 1

Figure 1: Effects of RT on mass, strength and performance. (a) Evolution of body mass (in g) over time for CG (white plots, n=5 animals) and TG (black plots, n=15 animals). No difference was observed between the two groups ($*P > 0.05$). (b) Relative muscle mass for FDP, biceps and deltoid for CG (n=10 animals and n=20 muscles; white columns) and TG (n=10 animals and n=20 muscles; black columns). Data show a significant effect of training on relative muscle mass of FDP and deltoid ($***P < 0.001$). (c) Percentage of body mass that CG (white column, n=5 animals) and TG (black column, n=15 animals) could raise during the climbing bout at maximal load. Data show a 2.4-fold increase of strength after training ($***P < 0.001$). (d) Mechanical power developed by the TG during the first (grey column, n=7 animals) and the last training session (black column, n=7 animals). Data show a 2.3-fold increase of mechanical power at the end the training ($***P < 0.001$). All P -values were calculated using a two-tailed Student's t-test. Data are presented as mean \pm s.e.m.



Figure 2: Time courses of ADP production by myofibrils from control (white plots) and trained (black plots) animals. (a) Typical curve obtain by Rapid Flow Quench and HPLC in TG for FDP myofibril preparation. The fit represented by the dashed lines was obtained with the model including three steps *i.e.* exponential ADP burst, driven by k_{OBS} , fast linear steady-state driven by k_F and slow linear steady-state driven by k_S ($R^2_{adj} = 0.99$; **** $P < 0.0001$). (b) ADP production per myosin head over time (*i.e.* m-ATPase activity) for CG (n=7 series x43 points) and CT (n=7x43) for biceps. (c) ADP production over time for CG (n=5x43) and CT (n=5x43) for deltoid. (d) ADP production over time for control (n=3x43) and trained (n=5x45) conditions in FDP. Data are expressed for CG (white columns) and TG (black columns) as mean \pm s.e.m.

Figure 3: Training effect on myofibrillar ATPase activity at 4°C. The analysis of the time course of m-ATPase activity under Calcium-activated condition and a maximal shortening velocity (*i.e.* zero load) showed a significant interaction effect between the training effect and muscle type ($9.2\% \pm 0.7$ of total variation; $**P < 0.01$) indicating that m-ATPase activity was majored in a different extend among muscles after training in the three muscles studied. A main effect of training on the ADP production was observed for k_F (57.9% of total variation; $****P < 0.0001$) and k_S (56.5% of total variation; $****P < 0.0001$) and a main muscle type effect was observed for k_{OBS} (50.3% of total variation; $**P < 0.001$). **(a)** The ADP burst rate constant, k_{OBS} , was increased after RT in both biceps ($*P < 0.05$) and FDP ($***P < 0.001$). **(b)** The fast steady-state rate constant, k_F , was increased in biceps ($*P < 0.05$), deltoid ($***P < 0.001$) and FDP ($***P < 0.001$) after RT. **(c)** The slow steady-state rate constant, k_S , was increased in biceps and deltoid ($***P < 0.001$). All interactions and main effects P -values were calculated using two factors ANOVA and in case of significant interactions, P -values were calculated using Tukey post-hoc tests. Data are expressed for CG (white columns) and TG (black columns) as mean \pm s.e.m.

Figure 4: Effect of training on MHC composition. Composition of MHC isoform in (a) biceps, (b) FDP, and (c) deltoid. The MHC isoform compositions were measured by RT-qPCR. Several series of repetitions were performed (n=6 repetitions). An increase in MHC2A expression was observed in both biceps and FDP ($*P < 0.05$) associated to a diminution of MHC2X in the same muscles ($*P < 0.05$). All P -values were calculated using a two-tailed Student's t-test. Data are presented for CG (white columns) and TG (black columns) as mean \pm s.e.m.

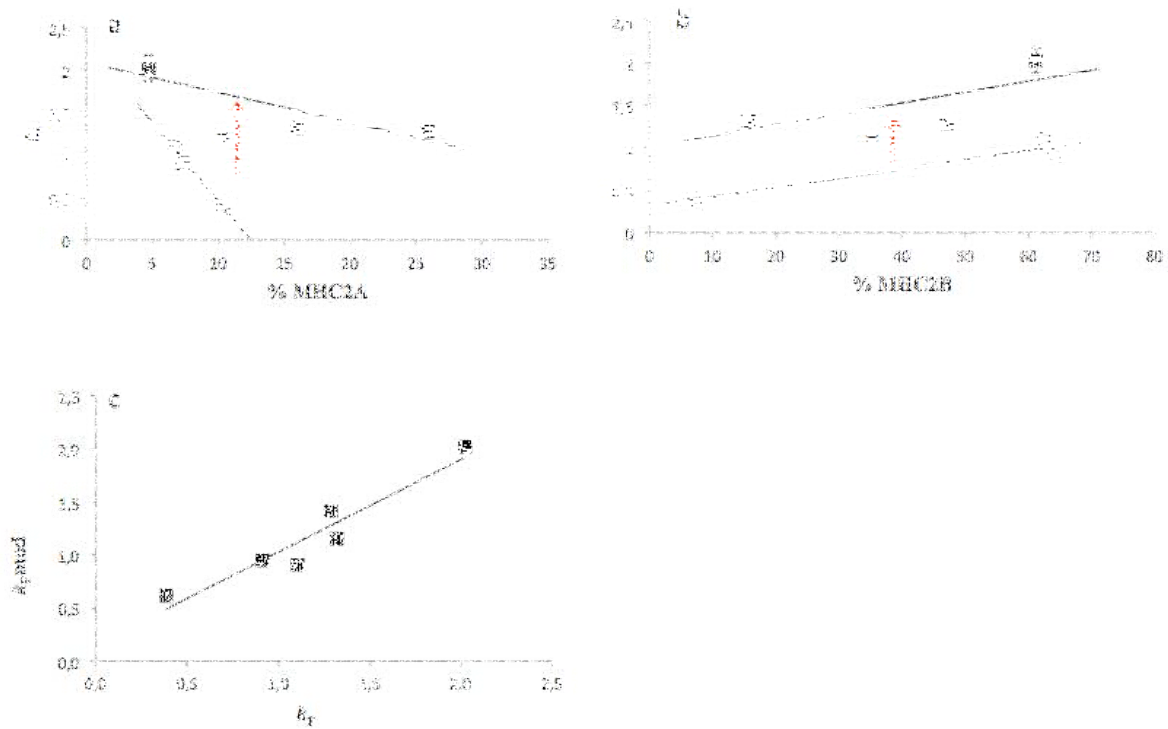


Figure 5: k_F is increased in MHC2A and MHC2B fibers after training. Effect of RT on k_F in MHC2A (a) and MHC2B (b). The significant elevation of the y-intercept between CG (white plots) and TG (black plots) indicates the effect of training (red arrow) on m-ATPase activity in MHC2A and MHC2B (* $P < 0.05$). No concomitant modification of the slope could be evidenced in both MHC1 and MHC2X between CG and TG ($P > 0.05$). (c) Fit between k_F and k_F mod. The training effect was estimated from the model at 2.2-fold increase on k_F ($R^2 = 0.91$, * $P < 0.05$). All P -values were calculated using the analysis of covariance test. Data are expressed as mean \pm s.e.m.

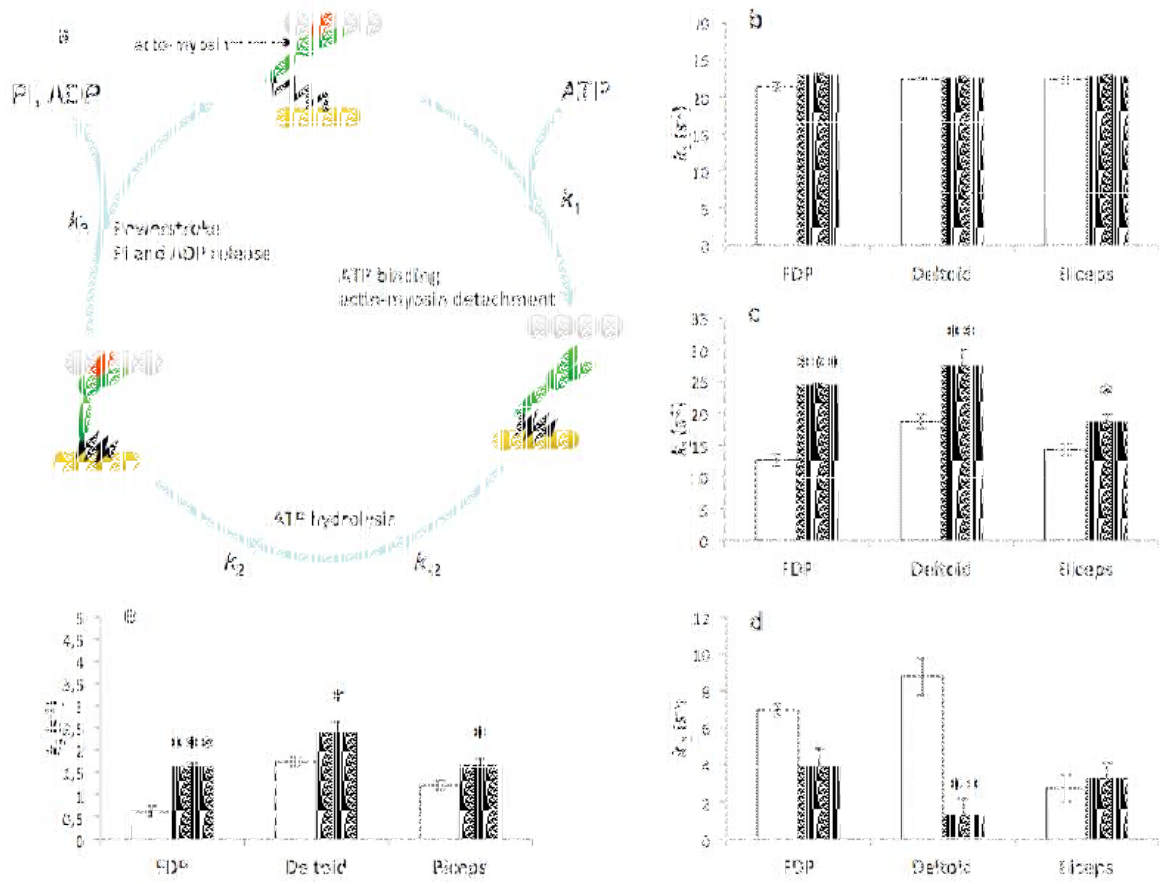


Figure 6: Effect of training on the kinetic constant of the cross-bridge cycle. (a) Simple scheme of the cross-bridge resumed to the three main steps. (b) k_2 (top) and k_{-2} (bottom), that drive the ATP hydrolysis, are affected by RT. Indeed, k_2 is increased in FDP ($***P < 0.001$), deltoid ($**P < 0.01$) and biceps ($*P < 0.05$) after RT and k_{-2} is decreased in deltoid ($**P < 0.01$). (c) k_3 , that drives the powerstroke and the liberation of ADP and Pi, is increased in FDP ($***P < 0.001$), deltoid ($*P < 0.05$) and biceps ($*P < 0.05$) after RT. (d) k_1 , that drives the first step of the modeled cross-bridge that describes ATP binding on the acto-myosin complex, seems unaffected by RT ($P > 0.05$). All P -values were calculated using a two-tailed Student's t-test. CG (white columns) and TG (black columns) conditions are expressed as mean \pm s.e.m.

Table 1. PCR Primer set sequences

Gene	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
MHC1	GAGGAGAGGGCGGACATT	ACTCTTCATTCAGGCCCTTG
MHC2a	TGGTGTCCCTGTTGAAAGAA	TTGATCAGCTGGTCGCATC
MHC2b	TGGCTCTGATGCAAGAGAAA	TCTGCATCAGCTAAGCCATC
MHC2x	GAAGGCCAAGAAGGCCATC	GGTCACTTTCCTGCTTTGGA

Conclusion

Cette étude est la première à montrer sans ambiguïtés une adaptation de l'activité ATPasique indépendante de tout changement phénotypique. L'analyse de la phase de l'état stable rapide montre un effet majeur de l'entraînement sur l'activité ATPasique (*i.e.* k_F) quelque soit le muscle étudié. Le gain moyen d'activité ATPasique de 123% observé dans notre étude est bien supérieur aux gains de 23 % et 24 % obtenus précédemment suite à un entraînement d'endurance (Schluter & Fitts, 1994; Roels *et al.*, 2008). L'augmentation de k_F s'étend de 42% pour le biceps jusqu'à 242% pour le FDP. A l'escalade, le FDP représente le facteur limitant à la performance. En effet, ce muscle, peu sollicité chez les individus sédentaires, est confronté à des contraintes mécaniques majeures lors de la pratique de l'escalade. Il doit être capable de supporter le poids du grimpeur, auquel s'ajoute dans notre étude, la charge fixée à la base de la queue de l'animal. Les contraintes imposées à nos animaux représentent pour un grimpeur de 75 kg de soulever plus de 200 kg sur une distance verticale de 10 m. Dans ces conditions, le FDP est sollicité massivement et représente le premier muscle du membre supérieur à fatiguer lors d'une ascension (Deyhle *et al.*, 2015). Cette implication majeure du FDP dans l'escalade serait de nature à expliquer l'augmentation particulièrement marquée de k_F au sein de ce petit muscle comparé aux deux autres muscles étudiés dans notre étude.

Pour s'assurer que les gains d'activité ATPasique n'étaient pas le reflet de changements phénotypiques, nous l'avons exprimée en fonction du pourcentage de fibres MHC2A et MHC2B. Les résultats présentés ici montrent pour la première fois une augmentation de l'activité ATPasique de l'ordre 100% pour ces isoformes sous l'effet de l'entraînement. L'application d'un modèle simplifié du cycle mécano-chimique nous a permis d'identifier la localisation des adaptations moléculaires. Les résultats montrent que ces adaptations interviendraient majoritairement lors de l'étape de libération des produits de l'hydrolyse, et dans une moindre mesure, lors de l'étape d'hydrolyse de l'ATP. Ces données sont en accord avec la théorie classique selon laquelle la libération des produits de l'hydrolyse est l'étape la plus lente et donc limitante du cycle mécano-chimique dans nos conditions expérimentales (Lionne *et al.*, 1995).

L'entraînement a induit des gains de puissance mécanique de 136,7%. Cette puissance, déterminée par le travail potentiel développé contre la gravité divisé par le temps de montée du rongeur, est à mettre en relation avec les gains de puissance chimiques de 123% cités ci-dessus. En conclusion, les adaptations de l'activité ATPasique (gain de puissance chimique) seraient de nature à expliquer les gains de performance massifs observés (gains de puissance mécanique).

Etude 4 : Évolution du modèle classique des effets de l'entraînement vers une structure physiologique

Manuscrit en préparation

Philippe AG, Borrani F, Bègue G, Bonnieu A et Candau RB

Evolution des modèles empiriques des effets de l'entraînement vers une structure physiologique

PHILIPPE A.G.^{1*}, BORRANI F.², BEGUE G.¹, BONNIEU A.¹. et CANDAU R.B.^{1*}.

¹*Université de Montpellier, INRA, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, F-34060, Montpellier, France*

²*Institute of Sport Sciences and Department of Physiology, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland*

*Correspondent. Email: antony.philippe@umontpellier.fr; robin.candau@umontpellier.fr

Introduction

La théorie des systèmes a été appliquée pour décrire les effets de l'entraînement sur la performance physique [1–3]. Le sujet, athlète [2] ou animal [4] est assimilé à un système qui produit une performance (sortie du système) en réponse à une stimulation *i.e.* une charge de travail (entrée du système). Le modèle de Banister classiquement utilisé inclut deux composantes afin de distinguer les adaptations positives et la fatigue générées toutes deux par l'entraînement [3]. Plus récemment, il a été montré qu'un modèle composé d'une seule fonction de transfert (*i.e.* aptitude) était suffisant pour suivre la performance auprès de sujets entraînés en endurance sur bicyclettes ergométriques et en laboratoire [5]. Un modèle plus complexe à dose-réponses variables, dans lequel la réponse à une charge de travail dépend des charges précédentes a permis de mieux comprendre les effets de l'entraînement [6], et notamment de progresser dans le domaine de la simulation de stratégies d'entraînement avec périodes de surcharge et d'affutage afin d'optimiser la performance [7–9]. Cependant, ce modèle demeure lui aussi essentiellement à caractère empirique dans la mesure où la signification biologique de ses composants reste encore à être établie. Ce type de modèle suppose que la réponse à une charge travail est de type impulsionnelle (figure 1), puis décroît selon une loi exponentielle : $g(t) = k.e^{-t/\tau}$ où k est une constante d'amplitude et τ une constante de temps décrivant la vitesse de décroissance de la réponse impulsionnelle (à $t = 4 \tau$, $g(t)$ est diminué de 98%). Cependant, lorsque le muscle strié est sollicité lors d'un entraînement en

force ou en résistance par exemple, ces derniers ne s'adaptent pas instantanément mais progressivement. Cette adaptation est le résultat d'un remodelage qui s'exprime à la fois à l'échelle macroscopique, dirigé essentiellement par des changements phénotypiques et par un déséquilibre de la balance protéique, ainsi qu'à l'échelle microscopique et qualitatif porté par une adaptation de la tension spécifique (P_0/CSA), de la vitesse de raccourcissement des fibres (V_0) ou de l'activité ATPasique elle-même. Après 10 semaines d'entraînement en résistance de type escalade avec charges additionnelles, une hypertrophie de tous les isoformes de fibres musculaires a été observée [10]. Cette hypertrophie est accompagnée de changements phénotypiques en faveur des fibres intermédiaires de type 2A [11], et parfois d'une augmentation de la V_0 de ces mêmes fibres [12].

Cette réalité des adaptations à l'entraînement en résistance nous indique que la réponse à une charge de travail n'est pas de type impulsionnelle c'est à dire instantanée à l'issue de la séance d'entraînement, mais qu'elle se met progressivement en place sur un laps de temps de plusieurs jours. De façon générale, les processus biologiques répondent typiquement selon une cinétique exponentielle. Il semble en être de même pour le muscle strié squelettique. Ainsi la réponse des transcrits aux charges d'entraînement est de nature exponentielle [13] et l'hypertrophie induite ne survient que progressivement elle aussi [10].

L'objectif de cette étude est donc de formuler un modèle qui soit de nature à décrire une réponse à l'entraînement non pas de type impulsionnelle, mais de nature exponentielle et apte à prendre en considération le temps nécessaire à la mise en place des mécanismes adaptatifs du tissu musculaire (figure 1). Le modèle classique des effets de l'entraînement et ses dérivés possèdent une structure parallèle du fait de la structure similaire des deux fonctions de transfert impulsionnelles antagonistes (*i.e.* aptitude et fatigue) qui varient ensemble en parallèle tout au long de la période étudiée [2]. A l'opposé, la description des adaptations biologiques qui surviennent en réponse à un stimulus requiert un modèle sériel dans la mesure où la phase de croissance exponentielle est suivie d'une décroissance vers l'état initial d'homéostasie en l'absence de nouvelle stimulation. Cette phase de décroissance correspond dans notre cas à une période de désentraînement. Ainsi, la nouvelle structure mathématique proposée comporte deux phases exponentielles bien distinctes qui se succèdent l'une à l'autre. Sur cette base, deux nouvelles formulations de modèles ont été testées : (1) un modèle A_{pt} à simple fonction de transfert bi-exponentielle en série pour décrire la dynamique des adaptations au sein du muscle strié squelettique, et (2) un modèle $A_{pt}F$ similaire à A_{pt} auquel a été ajouté à la fonction d'aptitude bi-exponentielle, une simple fonction impulsionnelle négative décrivant la fatigue. La fatigue étant quant à elle maximale immédiatement à l'arrêt

de la séquence d'entraînement. Dans ce contexte, le but de la présente étude était de comparer ces deux modèles à complexité croissante à celui classique de Banister, sur la base des données issues de 15 rongeurs entraînés en résistance selon le modèle d'escalade décrit précédemment [4].

Méthode

Animal, protocole d'entraînement et quantification des charges et performances.

Les données utilisées pour cette étude sont issues de l'étude 3. Brièvement, 15 rats Wistar Han âgés de 8 semaines ont suivi l'entraînement durant 4 semaines. Les animaux étaient élevés à température et humidité constantes et maintenus dans un cycle jour-nuit 12 :12 h. Ils avaient accès à une nourriture standard et à de l'eau *ad libidum*. Après 3 jours de familiarisation, les rats étaient entraînés selon un protocole d'entraînement résistance de type d'escalade avec charges additionnelles. Les animaux devaient grimper une grille inclinée à 85° selon le protocole de de Lee et al. ici adapté à notre objectif de gains marqués de performance [14]. Des charges additionnelles étaient attachées à la base de la queue des animaux. Le poids initial était fixé à 50% de leur poids de corps et incrémenté progressivement pour atteindre 150% de leur poids de corps à l'issue des 4 semaines d'entraînement [4,10]. La séance d'entraînement consiste en une série de 10 répétitions espacées chacune par 2 minutes de repos à raison de 5 séances par semaine, pendant l'après midi. L'entraînement était arrêté si l'animal refusait de grimper malgré les sollicitations de l'expérimentateur. Tous les animaux ont terminé l'entraînement sans difficulté notable.

Quantification des charges et performances

La performance était appréciée au travers du travail potentiel fourni contre la force due à la gravité (W en J):

$$W = (m_{\text{charge}} + m_{\text{rat}}) \cdot g \cdot \Delta h \cdot N$$

Où la masse (m) est exprimée en kg, g est l'accélération due à la gravité exprimée en m.s^{-2} , Δh est la distance grimpée en m, et N est le nombre de répétitions (*i.e.* $N = 10$).

La performance était quantifiée au travers de la puissance développée avec les charges additionnelles (W' en W) en prenant en compte le travail fourni et le temps d'escalade :

$$W'_i = W_i \cdot t^{-1}$$

Où t est le temps de montée en seconde. Chaque répétition durait entre 3 et 25 secondes, en fonction de la charge soulevée par les rats et de leur degré d'aptitude. Afin de prendre en compte la relation caractéristique parabolique qui existe entre la puissance et la charge, les puissances ont été exprimées en équivalent puissance optimale. La relation entre la puissance et la charge établie par Izquierdo et al. [15] a été utilisée :

$$W'_{iz} = -0,14 W\%^2 + 16,33 W\% + 12,49$$

Où le terme $W\%$ représente charge exprimée en % de la charge maximale.

Au final, la performance réelle exprimée en équivalent puissance à charge optimale dépend de la puissance mesurée au jour i (W'_i) pondérée par un facteur d'équivalence noté U :

$$Perf_{réelle,i} = W'_i + U$$

$$\text{Où } U = \frac{W'_i \cdot Fc}{100} \text{ avec } Fc, \text{ un facteur correctif égal à } Fc = \frac{(W'_{iz,opt} - W'_{iz,i})}{W'_{iz,opt}} \cdot 100$$

Où $W'_{iz,opt}$ est la valeur maximale de W'_{iz}

Modélisation des effets de l'entraînement

Un système est déterminé par au moins une fonction de transfert $H(t, \theta)$ reliant son entrée à sa sortie. Les paramètres du modèle caractérisant la réponse à l'entraînement du sujet (noté θ) sont estimés par l'ajustement de la sortie du modèle (i.e. performance modèle) à la performance réelle. La fonction de transfert $H(t, \theta)$ donne la performance modèle au temps t par le produit de convolution :

$$p(t) = p_0 + w(t) * H(t, \theta)$$

Où p_0 est la performance initiale, $W(t)$ est la charge de travail et $*$ le produit de convolution.

Le produit de convolution est défini par l'intégrale :

$$w(t) * H(t, \theta) = \int_0^t w(s) \cdot H(t - s, \theta) ds$$

La discrétisation de l'intégrale permet de quantifier la performance modèle en fonction des charges d'entraînement :

$$p(n\Delta t) = p_0 + \sum_{i=1}^{n-1} w(i\Delta t) \cdot H((n - i)\Delta t, \theta)$$

Où $t = n\Delta t$ et $w(0)$ prennent les valeurs de 0, et Δt est fixé à 1 jour.

Selon le modèle de Banister, la performance est définie par la différence entre les fonctions impulsionnelles d'aptitude et de fatigue qui évoluent en parallèle :

$$\hat{p}_n = p_0 + \sum_{i=1}^{n-1} k_A w_{i-1} e^{-\frac{(n-i)}{\tau_A}} - \sum_{i=1}^{n-1} k_F w_{i-1} e^{-\frac{(n-i)}{\tau_F}}$$

Où \hat{p}_n est la performance modèle au jour n, w_i représente les charges successives avec i variant du jour 1 à n-1, k_A , k_F , sont les constantes d'amplitude et τ_A et τ_F sont les constantes de temps de décroissance pour l'aptitude et la fatigue, respectivement.

Selon le modèle A_{pt} , la performance est définie par une fonction bi-exponentielle sérielle d'aptitude:

$$\hat{p}_n = p_0 + \sum_{i=1}^{n-1} k_A w_{i-1} (1 - e^{-\frac{(n-i)}{\tau_{A1}}}) \cdot U + \sum_{i=1}^{n-1} k_A w_{i-1} e^{-\frac{(n-i)-TD}{\tau_{A2}}} \cdot V$$

Où $U = 1$ et $V = 0$ quand $t < TD$ et $U = 0$ et $V = 1$ quand $t > TD$ avec $TD = 4\tau_{A1}$. TD est un délai nécessaire pour que la phase de décroissance ne commence qu'après la phase de croissance. τ_{A1} et τ_{A2} sont les constantes de temps de croissance et décroissance de l'aptitude, respectivement

Selon le modèle A_{ptF} , la performance est définie par la somme de la fonction bi-exponentielle sérielle d'aptitude et d'une fonction impulsionnelle de fatigue, qui évoluent en parallèle :

$$\hat{p}_n = p_0 + \sum_{i=1}^{n-1} k_A w_{i-1} (1 - e^{-\frac{(n-i)}{\tau_{A1}}}) \cdot U + \sum_{i=1}^{n-1} k_A w_{i-1} e^{-\frac{(n-i)-TD}{\tau_{A2}}} \cdot V - \sum_{i=1}^{n-1} k_F w_{i-1} e^{-\frac{(n-i)}{\tau_F}}$$

Où $U = 1$ et $V = 0$ quand $t < TD$ et $U = 0$ et $V = 1$ quand $t > TD$ avec $TD = 4\tau_{A1}$. k_F et τ_F sont respectivement les constantes d'amplitude et de temps de la fatigue.

Estimation des paramètres des modèles

Les paramètres des modèles sont déterminés par ajustement de la performance modèle à la performance réelle pour l'ensemble des rats grâce à une analyse mixte. Dans ce type d'analyse, certains paramètres sont déterminés individuellement pour chaque rat, et d'autres sont communs à l'ensemble du groupe. Ici, les constantes de temps ont été déterminées pour l'ensemble du groupe par la méthode des algorithmes génétiques et les constantes

d'amplitudes individuelles ont été déterminées par régression linéaire, en minimisant la somme des carrés résiduels entre les performances réelle et modèle :

$$RSS = \sum_r^R \sum_{n=1}^N (p_n - \hat{p}_n)^2$$

Où RSS et la somme des carrés résiduels, n prend N valeurs correspondant aux jours où la performance réelle est mesurée et r prend R valeurs correspondant au nombre de rats. La qualité de l'ajustement est appréciée par le coefficient de détermination :

$$r^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS}$$

Où TSS et la somme totale des carrée.

La méthode employée ici est détaillée dans son ensemble dans le chapitre 1.3 de la partie Etat de la littérature du présent document.

Résultats et discussion préliminaires

La table 1 présente les résultats de l'ajustement des 3 modèles testés et classés selon un ordre de complexité progressivement croissant en terme de paramètre et donc de degré de liberté. Bien que les ajustements soient significatifs pour tous les modèles, l'analyse des gains de variance n'a révélé aucune amélioration de la qualité de l'ajustement des deux modèles les plus complexes de Banister et $A_{pt}F$ comparé au modèle le plus simple A_{pt} . Selon le principe de parcimonie, le modèle comportant le moins de degrés de liberté a été retenu, *i.e.* le modèle A_{pt} . L'absence de gain de variance significatif avec l'ajout de la fonction de transfert associée à la fatigue (modèle $A_{pt}F$) est probablement lié au fait que la constante de proportionnalité de fatigue, k_F , n'était significative que pour 6 rats parmi les 15 ayant suivi l'entraînement. Il semble que les charges d'entraînement imposées n'aient pas été suffisamment lourdes pour qu'un effet négatif de l'entraînement suffisamment marqué puisse être détecté comme significatif sur l'ensemble du groupe. Ces résultats sont en accord avec notre précédente étude où le modèle à fatigue variable comportant également 5 degrés de liberté [6] n'apportait également pas d'amélioration dans la description des variations de la performance à l'entraînement [4]. Dans la présente étude, bien que les modèles A_{pt} et de Banister décrivent les variations de performance avec une précision similaire, les paramètres de ces deux modèles sont très différents (table 2). Le modèle de Banister présente des constantes de temps

d'un ordre de grandeur équivalent, soit 48 jours et 49 jours pour l'aptitude et la fatigue respectivement signifiant que la performance est corrélée à la fois à l'aptitude et à la fatigue. Ce résultat représente une limite au modèle de Banister déjà évoquée, liée à la structure même des fonctions de transfert [2]. De plus, ces constantes de temps d'environ 50 jours ne semblent pas réalistes. Le modèle A_{pt} quant à lui, présente une constante de temps de croissance de l'aptitude (*i.e.* τ_{A_1}) de 0,61 jours et de décroissance de l'aptitude (*i.e.* τ_{A_2}) de 3,68 jours. Ces résultats signifient que 2,4 jours ($t = 4 * \tau_{A_1}$) après une charge d'entraînement, l'adaptation est maximale (98% de la réponse est atteinte) et diminue jusqu'à retrouver son état initial après 15 jours environ en l'absence de nouvelle stimulation ($t = 4 * \tau_{A_2}$). Cette cinétique d'évolution de l'aptitude au cours du temps semble proche des cinétiques du remodelage musculaire observées en réponse à l'entraînement en résistance et en situation de d'hypokinésie.

La vitesse de réponse des transcrits en réponse aux charges d'entraînement fait apparaître une réponse maximale 24h après entraînement [13]. Ce résultat est en accord avec une phase de croissance exponentielle pour les adaptations musculaires qui se développent pendant 2,4 jours comme le suggère les résultats du modèle physiologique de la présente étude. Par ailleurs, le fait que la voie canonique de synthèse des protéine passant par MTOR demeure activée jusqu'à 24h post exercice [16] est aussi en accord avec une phase de croissance exponentielle de 2,4 jours dans la présente étude. En ce qui concerne la constante de temps de disparition des effets de l'entraînement de 3,68, de façon intéressante, cette dernière peut être rapprochée de celle de 5 J qui décrit la perte de masse musculaire observée au cours 15 jours d'hypokinésie en situation de suspension du train arrière chez des rongeurs [17].

Conclusion

Bien que le modèle A_{pt} n'améliore pas la qualité absolue de l'ajustement du modèle comparé au modèle classique de Banister notre choix de le retenir dans cette étude est guidé par 2 raisons principales. Premièrement, il comporte moins de degrés de liberté que celui de Banister et selon le principe de parcimonie, à coefficient de détermination équivalent, il doit être retenu. Deuxièmement, l'évolution des adaptations musculaires prévue par le modèle en réponse à une charge d'entraînement reflète mieux la réalité de la plasticité musculaire que ce soit pour les cinétiques de synthèse protéique comme pour la disparition des effets comparé

au modèle de Banister dans lequel la réponse positive maximale est supposée intervenir immédiatement dans le décours de la charge d'entraînement. Avec la nouvelle structure sérielle du modèle proposée, les adaptations ne sont pas de nature impulsionnelle mais progressivement croissante selon une fonction exponentielle de type $1 - e^{-t/\tau_{A1}}$, atteint son apex à $t = 4 \tau_{A1}$ puis décroît selon une exponentielle dirigée par τ_{A2} . Les paramètres du modèle A_{pt} représentent l'amplitude des adaptations (k_a), la vitesse de leur mise en place ($1/\tau_{A1}$) et la vitesse de leur disparition ($1/\tau_{A2}$), *i.e.*, vitesse de retour à l'homéostasie. L'étape suivante dans l'élaboration d'un modèle physiologique détaillé consistera à mesurer directement et précisément la cinétique des principales adaptations qui surviennent en réponses aux charges d'entraînement en résistance à savoir (i) l'optimisation de la commande motrice, $A_{commande}$, (ii) les changements phénotypique, A_{MHC} , (iii) l'hypertrophie, $A_{hypertrophie}$ et (iv) les changements d'activité ATPasique par tête de myosine, A_{ATPase} . La structure mathématique du modèle prendra alors une forme telle que la performance sera la somme des 4 fonctions de transferts bi-exponentielles et sérielles évoquées précédemment :

$$\hat{p}_n = p_0 + A_{commande} + A_{MHC} + A_{hypertrophie} + A_{ATPase}$$

Les valeurs des constantes de temps seront déterminées sur la base de mesures biologiques et les constantes d'amplitude seront appréciées, quant à elles, en minimisant la somme des moindres carrés entre performances réelles et celles prévues par le modèle, \hat{p}_n . Si plusieurs fonctions de transfert présentent des constantes de temps similaires, alors ces dernières pourront être globalisées en un seul et même terme par soucis de parcimonie. Toujours dans cet objectif, si la constante d'amplitude d'un terme se rapproche de 0, *i.e.* son impact sur la performance est quasi inexistant comme on est en droit de le suspecter d'ailleurs pour les adaptations propres au phénotype, le terme sera supprimé.

Figure et tables



Figure 1 : Comparaison de la réponse à une charge de travail pour les deux modèles étudiés. A gauche, selon le modèle de Banister, la charge de travail provoque une augmentation instantanée de l'aptitude d'amplitude k , puis une décroissance au cours du temps caractérisé par τ . A droite, selon les modèles A_{pt} et A_{ptF} proposés dans cette étude, l'aptitude d'amplitude k augmente de manière exponentielle à une vitesse déterminée par τ_{A_1} , puis décroît au cours du temps selon τ_{A_2} . Dans cette nouvelle structure de modèles proposée, la réponse n'est plus impulsionnelle mais bi exponentielle, les deux fonctions exponentielles étant montées en série.

Table 1

Modèle	R ²	Adj.R ²	F ratio	ddl	P
A ₂ *	0,71	0,65	12,24	3	< 0,001
Banister	0,79	0,73	13,16	4	< 0,001
A ₂ F ₁	0,76	0,67	8,23	5	< 0,01

* modèle retenu car les gains de variance pour les modèles plus complexes n'étaient pas significatifs

Table 2

Modèle	k _A	tau A ₁	tau A ₂	k _F	tau F
A ₂	0,0025 ± 0,0016	0,61	3,68	none	none
Banister	1,556 ± 3,099	none	48,34	1,79 ± 3,27	49,12
A ₂ F ₁	0,0037 ± 0,0025	0,33	5,72	0,0025 ± 0,0015	49,93

References

1. Banister EW, Hamilton CL. Variations in iron status with fatigue modelled from training in female distance runners. *Eur J Appl Physiol*. 1985;54(1):16–23.
2. Busso T, Häkkinen K, Pakarinen A, Carasso C, Lacour JR, Komi PV, et al. A systems model of training responses and its relationship to hormonal responses in elite weight-lifters. *Eur J Appl Physiol*. 1990;61(1-2):48–54.
3. Banister EW, Calvert TW, Savage MV, Bach T. A systems model of training for athletic performance. *Aust J Sports Med*. 1975;vol. 7:57–61.
4. Philippe AG, Py G, Favier FB, Sanchez AMJ, Bonniieu A, Busso T, et al. Modeling the responses to resistance training in an animal experiment study. *BioMed Res Int*. 2015;2015:914860.
5. Candau R, Busso T, Lacour JR. Effects of training on iron status in cross-country skiers. *Eur J Appl Physiol*. 1992;64(6):497–502.
6. Busso T. Variable dose-response relationship between exercise training and performance. *Med Sci Sports Exerc*. 2003 Jul;35(7):1188–95.
7. Sanchez AMJ, Galbès O, Fabre-Guery F, Thomas L, Douillard A, Py G, et al. Modelling training response in elite female gymnasts and optimal strategies of overload training and taper. *J Sports Sci*. 2013;31(14):1510–9.
8. Thomas L, Busso T. A theoretical study of taper characteristics to optimize performance. *Med Sci Sports Exerc*. 2005 Sep;37(9):1615–21.
9. Thomas L, Mujika I, Busso T. A model study of optimal training reduction during pre-event taper in elite swimmers. *J Sports Sci*. 2008 Apr;26(6):643–52.
10. Begue G, Douillard A, Galbes O, Rossano B, Vernus B, Candau R, et al. Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy. *PloS One*. 2013;8(2):e57141.
11. Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1993 Feb;74(2):911–5.
12. Trappe S, Costill D, Thomas R. Effect of swim taper on whole muscle and single muscle fiber contractile properties. *Med Sci Sports Exerc*. 2000 Dec;32(12):48–56.
13. Busso T, Flück M. A mixed-effects model of the dynamic response of muscle gene transcript expression to endurance exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2013 May;113(5):1279–90.
14. Lee S, Barton ER, Sweeney HL, Farrar RP. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2004 Mar;96(3):1097–104.
15. Izquierdo M, Ibañez J, Gorostiaga E, Garrues M, Zúñiga A, Antón A, et al. Maximal strength and power characteristics in isometric and dynamic actions of the upper and lower extremities in middle-aged and older men. *Acta Physiol Scand*. 1999 Sep;167(1):57–68.
16. Pagano AF, Py G, Bernardi H, Candau RB, Sanchez AMJ. Autophagy and protein turnover signaling in slow-twitch muscle during exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2014 Jul;46(7):1314–25.
17. Baldwin KM, Haddad F, Pandorf CE, Roy RR, Edgerton VR. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front Physiol*. 2013;4:284.

DISCUSSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

Plasticité de la myosine ATPase en réponse à l'entraînement.

L'entraînement en résistance est responsable, au sein du muscle strié squelettique, d'un remodelage profond qui s'opère à différents niveaux d'organisation du muscle. D'un point de vue quantitatif, les adaptations sont relativement bien connues. En réponse à un entraînement en résistance, elles sont dirigées essentiellement par une hypertrophie et par un changement phénotypique en faveur des fibres intermédiaires représentées par les fibres de type 2A. Compte tenu des variations relativement discrètes de la masse musculaire (+ 23% et + 31% respectivement pour le deltoïde et le FDP) et des changements phénotypiques vers un profil plus lent, les fibres de type 2X et 2B étant partiellement converties en 2A, induits par notre protocole d'entraînement en résistance, nous avons suspecté une adaptation plus fine, d'ordre qualitatif, qui pourrait expliquer les gains de puissance observés. Les résultats indiquent une augmentation de la puissance chimique de la myosine ATPase de plus de 110%. Une représentation simplifiée du cycle mécano-chimique, réduit aux 3 étapes fondamentales (*i.e.* collision de l'ATP sur le complexe actine-myosine, l'hydrolyse de l'ATP et la libération des produits de l'hydrolyse) suggère que ces gains de puissance chimique sont liés principalement à une augmentation de la vitesse de libération des produits de l'hydrolyse de l'ATP (+ 164%, + 40% et + 37% respectivement pour le FDP, le biceps et le deltoïde) et dans une moindre mesure, à une augmentation de la vitesse de l'étape d'hydrolyse (+ 95%, + 30% et + 47% pour le FDP, le biceps et le deltoïde, respectivement). Cependant, la technique de Rapid Flow Quench utilisée pour établir la cinétique de production de phosphate par les myofibrilles en conditions activées (*i.e.* en présence de calcium) ne permet pas de mesurer avec certitude la vitesse de l'étape de collision de l'ATP. Bien que nous ayons mesuré la cinétique du burst et que la vitesse de fixation de l'ATP à concentration saturante soit suffisamment rapide pour ne pas influencer l'activité ATPasique à l'état stable, nous ne pouvons pas exclure totalement un effet de l'entraînement sur la vitesse de fixation de l'ATP. La mesure de la vitesse de formation du complexe actine-myosine-ATP est permise par les techniques de chasse à l'ATP froid (cold ATP chase experiments en anglais) (Barman & Travers, 1985). Cette étape irréversible est dirigée par k_{coll} , la constante de vitesse de formation du complexe collisionnel avec $k_{\text{coll}} = k_2[\text{ATP}]/(K_1 + [\text{ATP}])$ où K_1 est la constante de dissociation de l'ATP du complexe actine-myosine et k_2 et la constante de vitesse d'isomérisation de la myosine (Lionne *et al.*, 2002).

Une augmentation du nombre de ponts acto-myosine sous l'effet de l'entraînement ?

L'activité ATPasique de la myosine est définie comme la production de phosphate (ou d'ADP) par tête de myosine, et par seconde. Dans nos méthodes, nous avons mesuré par HPLC la quantité totale d'ADP libre et lié au complexe actine-myosine) produit au cours du temps en conditions d'activation maximale. Cette méthode ne fournit pas d'information directe quant au nombre de têtes de myosine pleinement compétentes d'un point de vue enzymatique et encore moins sur le nombre de têtes actives à l'instant t . L'augmentation de la production de phosphate au cours du temps observée dans nos conditions entraînées pourrait ainsi être liée à une augmentation de la fraction de têtes de myosine pleinement compétentes d'un point de vue enzymatique. Une titration des têtes de myosine permettrait de mesurer ce nombre de têtes compétentes (Lionne *et al.*, 2002). Cependant, dans une étude antérieure sur les effets de l'entraînement en endurance, une augmentation de plus de 20% de l'activité ATPasique a été observée, et ce, sans augmentation du nombre de têtes de myosine compétentes (Roels *et al.*, 2008). Dans ces conditions, nous pouvons difficilement associer l'augmentation de l'activité ATPasique mesurée à une augmentation du nombre de têtes compétentes. En revanche, nous ne pouvons pas exclure une augmentation du nombre de têtes de myosine effectivement actives. Cette proportion de tête en interaction forte avec l'actine à l'instant t est inférieure à 10% lors du raccourcissement à vitesse maximale, mais peut être grandement majorée dans certaines situations. En effet, lors des contractions isométriques et surtout excentriques, la proportion de tête active peut augmenter, essentiellement sous l'effet de la diminution de l'encombrement stérique et d'une position des têtes de myosine plus proche et plus favorable à une interaction avec les sites actifs de l'actine (Brunello *et al.*, 2007). Dans les conditions expérimentales de raccourcissement à vitesse maximale de notre étude, une augmentation du nombre de têtes actives ne peut être exclue. Les méthodes pour explorer ces deux hypothèses restent à être imaginées.

La force par pont actine-myosine est-elle augmentée à l'entraînement ?

L'entraînement en résistance induit une augmentation de la force isométrique (P_0). Rapportée à la surface de section des fibres, une augmentation de P_0/CSA signifie une adaptation qualitative du muscle squelettique. Une telle plasticité ne fait pas l'objet d'un consensus. Certaines études ont montré une augmentation de P_0/CSA en réponse à l'entraînement en résistance (Harber *et al.*, 2004; D'Antona *et al.*, 2006), et d'autres non (Widrick *et al.*, 2002; Shoepe *et al.*, 2003). Chez nos animaux entraînés, une augmentation extrêmement marquée de

la puissance mécanique et de la force développées en condition d'escalade avec charges lourdes en l'absence d'une hypertrophie proportionnelle suggère fortement une augmentation de la tension spécifique. Une augmentation de la force par pont est probablement envisageable. Cependant, comment cette force pourrait-elle augmenter sous l'effet de l'entraînement ? Un accroissement des liaisons hydrophobiques lié à une optimisation de la surface de contact actine-myosine représente une hypothèse que l'on ne peut écarter. Une analyse structurale du complexe acto-myosine en état de post-powerstroke par cristallographie pourrait apporter des éléments de réponse. Les changements de conformation qui interviennent sous l'effet du calcium au sein des filaments épais se font plus rapidement que la fixation de la tête de myosine sur l'actine, suggérant que la génération de force pourrait être contrôlée par ces cinétiques de changements structuraux au sein de la myosine (Reconditi *et al.*, 2011; Fusi *et al.*, 2014). Les chaînes légères régulatrices (RLC) seraient en mesure de réguler l'orientation des têtes de myosines si bien qu'à température physiologique et en conditions relaxe, deux populations de têtes de myosines coexistent : certaines têtes orientées perpendiculairement et d'autres parallèlement aux filaments de myosines (Fusi, Huang, & Irving, 2015). Une modulation de l'équilibre conformationnel des régions RLC des têtes de myosines serait alors de nature à expliquer les variations potentielles de la force par pont et/ou leur nombre sous l'effet de l'entraînement. Dans l'étude antérieure conduite sur les effets de l'endurance, ni les changements d'isoformes des RLC, ni leur états de phosphorylation n'ont permis d'expliquer les gains d'activité ATPasique mesurés suggérant que d'autres mécanismes impliquant d'autres protéines sarcomériques pourraient être impliquées dans cette plasticité des moteurs moléculaires (Roels *et al.*, 2008).

Un modèle physiologique des effets de l'entraînement en résistance.

Les gains de puissance chimique développée lors de l'entraînement semblent déterminer l'essentiel des gains de puissances mécaniques mesurés. Cependant, à quelle vitesse survient cette adaptation de l'activité ATPasique ? Dans nos conditions, 4 semaines d'entraînement étaient suffisantes pour induire une augmentation de l'activité ATPasique par un facteur 2. Les animaux étaient capables de soulever $280 \pm 20\%$ de leur masse corporelle lors du test de répétition maximale. Les résultats de travaux précédents réalisés dans mon laboratoire d'accueil indiquent que la performance continue d'augmenter si l'entraînement perdure. Après 10 semaines d'entraînement selon le même protocole d'escalade, les animaux pouvaient soulever $350 \pm 23\%$ de leur masse corporelle lors du test de répétition maximale (Bègue, 2013). Ces résultats suggèrent que les gains d'activité ATPasique obtenus dans nos

conditions (*i.e.* 4 semaines d'entraînement) n'ont pas encore atteint de plateau et que la capacité d'adaptation de l'activité ATPasique de la myosine peut dépasser les 110% d'augmentation.

Des études antérieures ont montré une augmentation de l'activité ATPasique de l'ordre de 20% suite à un entraînement en endurance réalisé sur des périodes de 8 à 12 semaines (Schluter & Fitts, 1994; Roels *et al.*, 2008). L'intensité, mais également la durée de l'exercice physique seraient alors déterminants dans l'amplitude des gains d'activité ATPasique. A partir du modèle physiologique proposé dans l'étude 4, il deviendra possible d'établir une relation entre les gains de performance et les gains d'activité ATPasique. Des mesures d'activité ATPasique effectuées à différents temps au cours de la période d'entraînement permettront de déterminer sa cinétique de mise en place. Combinée à des mesures réalisées lors d'entraînement à différentes intensités (*i.e.* différentes charges de travail), la relation dose-réponse pourra être établie. Le modèle physiologique appliqué indique une performance maximale 2,4 jours après une charge de travail isolée. Cette donnée est en adéquation avec les cinétiques d'activation de la voie canonique de synthèse des protéines. En effet, MTOR, chef d'orchestre de cette voie, ainsi que 4E-BP1 (un effecteur activé par MTOR), peuvent rester activés jusqu'à 24h post exercice (Pagano *et al.*, 2014). De la même manière, la vitesse de réponse des transcrits géniques fait apparaître une réponse maximale 24 h après entraînement (Busso & Flück, 2013). Les paramètres du modèle physiologique semblent correspondre ainsi à la réalité des processus adaptatifs biologiques responsables des gains de performances observés à l'entraînement. De plus, la nature exponentielle du modèle proposé, par opposition aux modèles classiques où la réponse est impulsionnelle, reflète mieux la nature également exponentielle des processus adaptatifs biologiques cités ci-dessus. Des mesures biologiques complémentaires [activité ATPasique et de flux de synthèse protéique grâce notamment à la puromycine (Schmidt *et al.*, 2009)] permettraient d'établir un modèle physiologique détaillé où la performance serait expliquée par l'action combinée des mécanismes adaptatifs musculaires :

$$\hat{p}_n = p_0 + A_{commande} + A_{MHC} + A_{hypertrophie} + A_{ATPase}$$

Où $A_{commande}$, A_{MHC} , $A_{hypertrophie}$ et A_{ATPase} sont les fonctions de transfert propres à décrire les adaptations respectives de la commande motrice, du phénotype, des flux de synthèse protéique et de l'activité ATPasique par tête de myosine, A_{ATPase} .

A notre connaissance, ce travail est le premier à montrer une étonnante possibilité adaptative des unités contractiles et que cette adaptation de l'activité ATPasique, indépendante du phénotype, est à l'origine des gains de puissance mécanique observés suite à un entraînement de résistance. Un modèle simple du cycle mécano-chimique de la myosine ATPase indique une augmentation des vitesses des étapes d'hydrolyse de l'ATP et surtout de libération des produits de l'ATP. Bien que des mécanismes adaptatifs connus soient suspectés, aucun d'entre eux ne permet d'expliquer une augmentation aussi marquée de l'activité ATPasique. En effet, ni les phosphorylations des chaînes légères de myosine, ni même une augmentation du nombre de têtes de myosine pleinement compétentes sur le plan enzymatique ne serait en mesure d'expliquer le gain de plus de 100% de la puissance chimique observé suite à l'entraînement de résistance. Combinées à d'autres mesures biologiques, ces données permettraient d'établir un modèle physiologique, où la performance serait expliquée par les différentes formes de plasticité qui s'expriment au sein du muscle strié squelettique.

TRAVAUX

SUPPLEMENTAIRES

Chronic clenbuterol treatment compromises force production without directly altering skeletal muscle contractile machinery

G. Py^{1,2}, C. Ramonatxo^{1,2}, P. Sirvent³, A. M. J. Sanchez^{1,2}, A. G. Philippe^{1,2}, A. Douillard^{1,2}, O. Galbès^{1,2}, C. Lionne⁴, A. Bonniieu², A. Chopard^{1,2}, O. Cazorla⁵, A. Lacampagne⁵ and R. B. Candau^{1,2}

¹Faculté des Sciences du Sport, Université Montpellier, 700 avenue du Pic Saint-Loup, F-34060 Montpellier, France

²INRA, UMR866, Université Montpellier, 2 Place Viala, F-34060 Montpellier, France

³Clermont Université, Université Blaise Pascal, EA3533, Laboratoire des Adaptations Métaboliques à l'Exercice en Conditions Physiologiques et Pathologiques (AME2P), BP 80026, F-63171 Aubière Cedex, France

⁴Centre d'Etudes d'Agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé, UMR-5236 CNRS-UMI-UMI, France

⁵U1046 INSERM, UMR 9214 CNRS, Physiologie et Médecine Expérimentale du Cœur et des Muscles, University of Montpellier, CHRU Montpellier, Montpellier, France

Key points

- Clenbuterol is an adrenergic receptor agonist known to induce skeletal muscle hypertrophy and a shift towards faster muscle fibres, when administered chronically at high doses.
- However, when normalized to the muscle surface area, the increase in muscle force is no longer increased and even depressed.
- We show that muscle contraction and relaxation force kinetics were significantly reduced particularly in fast contracting muscles.
- We show that action potential-elicited Ca^{2+} transients were depressed in the fast contracting muscle.
- Our data show that chronic clenbuterol treatment reduces contractile efficiency, with altered contraction and relaxation kinetics, but without directly altering the contractile machinery. Lower Ca^{2+} release during contraction could partially explain these deleterious effects.

Abstract Clenbuterol is a β_2 -adrenergic receptor agonist known to induce skeletal muscle hypertrophy and a slow-to-fast phenotypic shift. The aim of the present study was to test the effects of chronic clenbuterol treatment on contractile efficiency and explore the underlying mechanisms, i.e. the muscle contractile machinery and calcium-handling ability. Forty-three 6-week-old male Wistar rats were randomly allocated to one of six groups that were treated with either subcutaneous equimolar doses of clenbuterol ($4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) or saline solution for 9, 14 or 21 days. In addition to the muscle hypertrophy, although an 89% increase in absolute maximal tetanic force (P_0) was noted, specific maximal tetanic force (sPo) was unchanged or even depressed in the slow twitch muscle of the clenbuterol-treated rats ($P < 0.05$). The fit of muscle contraction and relaxation force kinetics indicated that clenbuterol treatment significantly reduced the rate constant of force development and the slow and fast rate constants of relaxation in extensor digitorum longus muscle ($P < 0.05$), and only the fast rate constant of relaxation in soleus muscle ($P < 0.05$). Myofibrillar ATPase activity increased in both relaxed and activated conditions in soleus ($P < 0.001$), suggesting that the depressed specific tension was not due to the myosin head alteration itself. Moreover, action potential-elicited Ca^{2+} transients in flexor digitorum brevis fibres (fast twitch fibres) from clenbuterol-treated animals demonstrated decreased amplitude

G. Py and C. Ramonatxo contributed equally to the study.

after 14 days (-19% , $P < 0.01$) and 21 days (-25% , $P < 0.01$). In conclusion, we showed that chronic clenbuterol treatment reduces contractile efficiency, with altered contraction and relaxation kinetics, but without directly altering the contractile machinery. Lower Ca^{2+} release during contraction could partially explain these deleterious effects.

(Received 10 November 2014; accepted after revision 27 January 2015; first published online 27 February 2015)

Corresponding author G. Py: Faculté des Sciences du Sport, Université Montpellier, INRA, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, 2 place Viala, F-34060 Montpellier, France. E-mail: guillaume.py@univ-montp1.fr

Abbreviations AP, action potential; CSA, cross-sectional area; EDL, extensor digitorum longus; FDB, flexor digitorum brevis; SOL, soleus.

Introduction

β_2 -Adrenergic agonists, the most effective bronchodilators used to prevent asthma in humans, act by inhibiting smooth muscle contraction and increasing epithelial mucus clearance. In addition to their anti-asthma effect, chronic administration of these agonists causes a dramatic increase in skeletal muscle growth in various mammalian species (Kim *et al.* 1992; Mersmann, 1998; Kissel *et al.* 2001) and enhances human sports performance (Collomp *et al.* 2005; Sanchez *et al.* 2012; Hostrup *et al.* 2014a,b).

Synthetic β_2 -agonists such as cimaterol, clenbuterol, fenoterol, formoterol, salbutamol and salmeterol are based on the chemical structure of adrenaline and promote muscle growth through the stimulation of β_2 -adrenoceptors and subsequent activation of downstream signalling pathways. Clenbuterol, one of the selective β_2 -adrenergic agonists, is known to induce a specific protein anabolic effect in skeletal muscle (Mersmann, 1998; Kissel *et al.* 2001; Bricout *et al.* 2004; Lynch & Ryall, 2008). Because of this effect, clenbuterol has been extensively studied, especially for its therapeutic potential in various diseases affecting muscle mass or weakness. Effects of β_2 -adrenergic agonist treatment on muscle mass have been demonstrated in the contexts of muscular dystrophy, disuse (Ricart-Firinga *et al.* 2000), ageing, denervation and amyotrophic lateral sclerosis in both animals and humans (Lynch & Ryall, 2008). In addition to the effect on muscle mass, chronic clenbuterol treatment induces a fibre-type transition from slow to fast twitch fibres in animal models (Zeman *et al.* 1988; Polla *et al.* 2001; Mounier *et al.* 2007; Douillard *et al.* 2011). The phenotypic and metabolic changes induced by clenbuterol have raised questions about the impact of this treatment on muscle contractile function and ATPase activity. Previous studies have shown greater force-producing capacity in clenbuterol-treated muscle in both fast and slow twitch muscles (Dodd *et al.* 1996). Nevertheless, when maximal tetanic contraction was corrected for muscle cross-sectional area, muscle force was unchanged and even altered in soleus muscle (McCormick *et al.* 2010). These results suggest a potentially deleterious effect of chronic clenbuterol treatment on the skeletal muscle

contractile machinery. A preliminary study suggested that chronic clenbuterol treatment induces significant changes in the calcium (Ca^{2+}) signals associated with excitation–contraction coupling in fast twitch skeletal muscles (Sirvent *et al.* 2014). However, the mechanisms responsible for the changes in clenbuterol-induced contractility are not well understood.

Ca^{2+} handling is the primary regulator of force generation by cross-bridges in striated muscle. A reduction in Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum at each contraction would explain, at least in part, the reduced contractile function. However, muscle contractile function depends on contraction and relaxation processes. Relaxation involves at least three processes: termination of Ca^{2+} release, the kinetics of calcium dissociation from troponin and cross-bridge detachment, and Ca^{2+} uptake by the sarcoplasmic reticulum and myoplasmic Ca^{2+} buffering (Poggesi *et al.* 2005). Strong evidence indicates that cross-bridge kinetics is the major determinant of the time course of striated muscle relaxation and is responsible for 'load-dependent' changes in relaxation kinetics. Last, the kinetics of myosin head detachment from the thin filament is related to ATP binding. Thus, beyond muscle hypertrophy, an effect of clenbuterol on contraction and relaxation kinetics is expected.

The aim of the present study was to test the effect of chronic clenbuterol treatment on muscle force generation and relaxation kinetics in slow and fast twitch muscles and on myofibrillar ATPase activity in both relaxed and activated conditions. In addition, Ca^{2+} signalling was evaluated as it is the main regulator of contraction and relaxation kinetics.

Methods

All experiments complied with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, published by the National Institutes of Health (NIH Publications No. 85-23, Revised 1996). All experiments were approved by the Research Ethics Committee of Languedoc-Roussillon region ['Ethique sur l'Expérimentation Animale' approved the experimental protocol (# 36)].

Animals

Forty-three 6-week-old male Wistar rats (body mass: 236.3 ± 3.8 g; Charles River, Wilmington, MA, USA) were randomly allocated to one of six groups and housed in standard cages with a 12:12 h light–dark cycle and food and water available *ad libitum*. Treated rats received subcutaneous equimolar doses of clenbuterol ($4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) for 9 (CB-G9, $n = 7$), 14 (CB-G14, $n = 7$) or 21 days (CB-G21, $n = 8$). Body weights were measured daily and injection doses adjusted accordingly. To control for maturation effects due to the treatment duration, control rats were recruited and received a daily subcutaneous injection of an identical volume of saline solution for 9 (CTL-G9, $n = 7$), 14 (CTL-G14, $n = 7$) or 21 days (CTL-G21, $n = 7$). All measurements were made 24 h after the last treatment. While animals were anaesthetized with pentobarbital sodium, extensor digitorum longus (EDL), soleus (SOL) and flexor digitorum brevis (FDB) muscles of both left and right hindlimbs were rapidly dissected out. At the end of the surgical procedure, the animals were killed with a lethal dose of pentobarbital.

Muscle phenotype

SOL and EDL muscle phenotypes were determined by the Kaiser and Brooke myosin-ATPase coloration method (Brooke & Kaiser, 1970). All twitch fibres from each muscle were selected and identified as being type I fibres, type IIa fibres or type IIx-IIb fibres.

Kinetics of muscle force activation and relaxation kinetics

EDL and SOL muscles from the right hindlimb were surgically exposed. The excised muscles were immediately placed in a custom-built Plexiglas chamber filled with Krebs-Ringer solution [composition (in mM): NaCl 11.9, KCl 0.5, CaCl_2 0.125, MgSO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1, glucose 1, NaHCO_3 2.5, mannitol 0.11] equilibrated with 95% O_2 /5% CO_2 gas and maintained at 25°C , pH 7.4.

Contractile properties of the right EDL and SOL were assessed *in vitro* according to the methods described in detail previously (Lynch *et al.* 2001; Ryall *et al.* 2002). *In vitro* contractile measurements began with the determination of the muscle optimal length (L_0) for isometric tension development. After a 15 min equilibration in the bath, the muscle was connected to an isotonic force transducer (model 305B; Cambridge Instruments, Aurora Scientific, Inc., Ontario, Canada) and stimulated along its entire length with platinum wire electrodes. After the determination of L_0 from the maximum isometric twitch force, all subsequent contractile properties were measured

at L_0 . Optimum twitch fibre length (L_f) was determined by multiplying L_0 by previously determined ratios of fibre length to muscle length: 0.44 for EDL and 0.71 for SOL (Brooks & Faulkner, 1988; Ryall *et al.* 2002). Isometric tetanic tension was determined at different frequencies of stimulation (701B Stimulator; Aurora Scientific), ranging from 1 to 100 Hz for SOL and 150 Hz for EDL (pulse duration 0.5 ms, train duration 500 ms). A rest period of 1 min was applied between each tetanic stimulation. Maximal isometric tetanic tension (P_0) was determined from the plateau of the frequency–force curve. After all measurements, the muscle was removed from the bath, trimmed of connective tissue, blotted dry and weighed on an analytical balance. Specific force (sP_0 ; N cm^{-2}) was calculated for each muscle according to the well-accepted procedure that accounts for muscle cross-sectional area, determined after dividing muscle mass by the product of L_f and 1.06 mg mm^{-3} , according to Lynch *et al.* (2001).

Fitting of muscle mechanical kinetics

A non-linear regression was used to fit the data obtained in the CTL-G21 and CB-G21 groups only to a model that defines the kinetics of muscle force production and relaxation in EDL and SOL muscles during a single 500 ms twitch (pulse duration of 0.5 ms at 100 Hz for SOL and 150 Hz for EDL). The model used to fit the force development and relaxation kinetics for EDL and SOL and determine the parameter values is presented in Fig. 1. Data were fitted using GraphPad Prism 4 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA). During the force production phase, the rate constant of the force development (k_{ACT} , s^{-1}) was determined. The time course of full force relaxation was biphasic, starting with a slow, seemingly linear, phase (rate constant, Slow k_{REL} , s^{-1}) followed, after a ‘shoulder’, by a fast, approximately monoexponential, relaxation phase (rate constant, Fast k_{REL} , s^{-1}).

Myofibril preparation

SOL (slow twitch) muscle from CTL-G21, CB-G14 and CB-G21 groups as well as EDL (fast twitch) muscle from CTL-G21, CB-G9, CB-G14 and CB-G21 groups was used for these experiments. Briefly, muscles were immersed in ice-cooled Ringer buffer [composition (in mM): Tris-HCl 50, pH 7.0, NaCl 100, KCl 2, MgCl_2 2, EGTA 1, dithiothreitol 1, phenylmethanesulfonyl fluoride 0.2, leupeptin 0.01, pepstatin 0.005 and NaN_3 0.5] at rest length. From these latter SOL and EDL muscles, myofibrils were prepared as previously described (Candau *et al.* 2003). The total myosin head concentration in the myofibrillar suspension was measured by absorbance at 280 nm of a 1:10 dilution of the suspension in 2% SDS

(Houadjeto *et al.* 1992), based on the assumption that the molar extinction coefficient and percentage of myosin in SOL and EDL myofibrils are the same as in psoas myofibrils (Herrmann *et al.* 1994; Iorga *et al.* 2004).

Myofibrillar ATPase activity

ATPase measurements were carried out in a home-built, thermostatically controlled, Rapid Flow Quench apparatus (Barman & Travers, 1985). Experiments were performed at 4°C to slow down the unloaded shortening velocity (V_0), and thus to increase the duration of the unloaded shortening phase (t_B) and improve the time resolution. The chosen temperature of 4°C, although it slows the shortening velocity, still allows the myofibrils to behave and contract normally (Candau *et al.* 2003).

In the Rapid Flow Quench apparatus, myofibrils were mixed with [γ - 32 P]ATP (2.5 μ M myosin heads + 25 μ M [γ - 32 P]ATP in the reaction mixture at 4°C). Reaction mixtures were quenched in acid (22% trichloroacetic acid and 1 mM KH_2PO_4) at different times and the [32 P]Pi was assayed. Reaction mixtures with incubation times from 200 ms to 10 s were obtained with this apparatus. For longer incubation times, myofibrils and [γ - 32 P]ATP were mixed in a beaker at 4°C, where one sample of the reaction mixture was taken and quenched every 10–15 s for 3–10 min. The amounts of total Pi (i.e. free Pi plus myosin head-bound Pi) were determined in the quenched reaction mixtures by the filter paper method of Reimann and Umfleet (1978). Relaxing and activating buffers were used to obtain relaxed and activated conditions, respectively, i.e. 50 mM Tris-acetate, pH 7.4, 100 mM

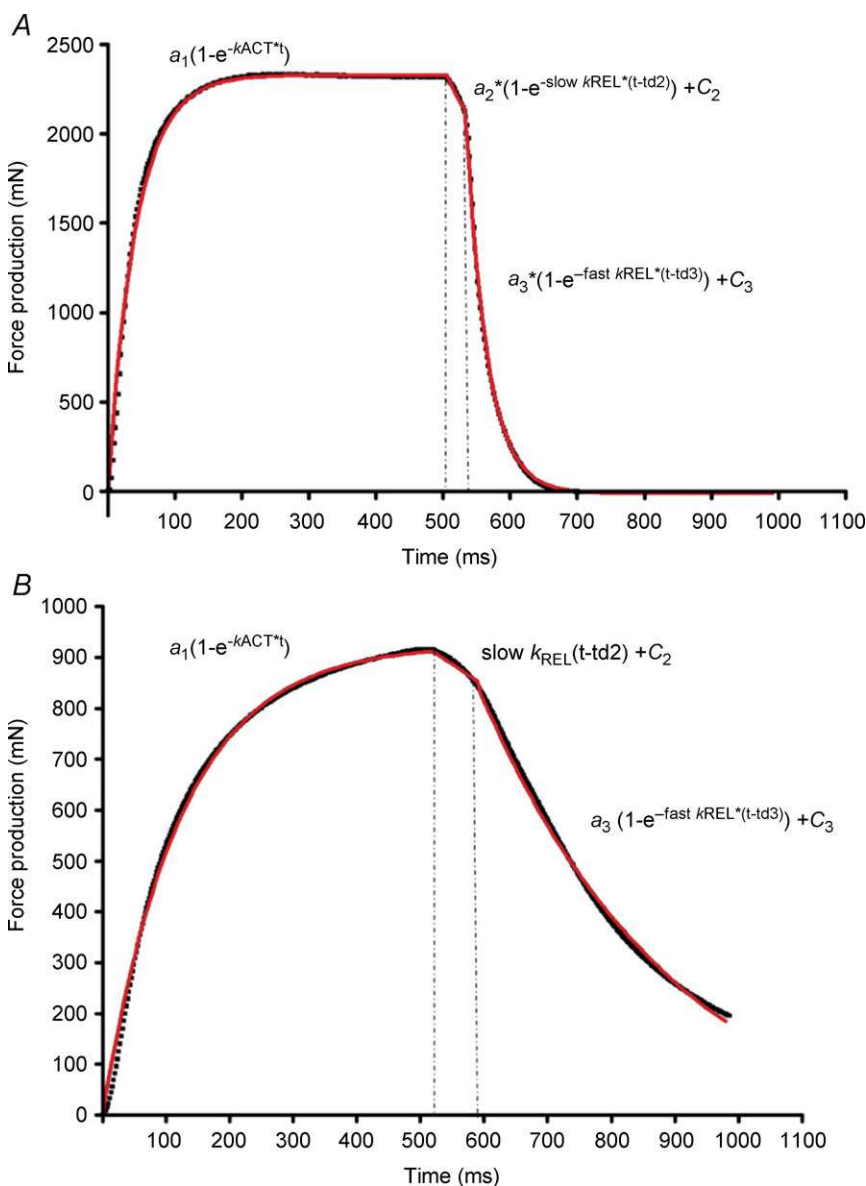


Figure 1. Fitting of force activation and relaxation in EDL (A) and SOL (B) muscles
Recording shows the fitting curve (red line) obtained from the data curve (black line) recorded at 150 and 100 Hz for EDL and SOL, respectively. The kinetics of force development was described by one exponential increase: $a_1(1 - e^{-k_{ACT}t})$, where a_1 is the value of force at the maximal curve asymptote (mN); e is the exponential function; k_{ACT} (s^{-1}) is the rate constant of the force development; and x is the time (ms). The kinetics of force relaxation was described using two exponential slow and fast decays: $a_2(1 - e^{-\text{slow } k_{REL}(t - td2)}) + C_2$ and $a_3(1 - e^{-\text{fast } k_{REL}(t - td3)}) + C_3$ where C_2 and C_3 are the force levels at the beginning of each decay; $\text{slow } k_{REL}$ and $\text{fast } k_{REL}$ are the rate constants of the slow and fast phases of tension decline, respectively; a_2 and a_3 are the basal relaxation force level C_2 and C_3 , respectively; and $td2$ and $td3$ are the time delays at the beginning of each decay.

potassium acetate, 5 mM KCl and either 0.1 mM CaCl₂ and 2 mM magnesium acetate for the activating buffer (with Ca²⁺), or 2 mM EGTA and 5 mM magnesium acetate for the relaxing buffer (without Ca²⁺).

Modelling ATPase activity kinetics

Although the first phase of steady-state ATP hydrolysis was used as a measure of the ATPase activity during unloaded shortening of the calcium-activated myofibrils, the entire kinetics of ATP hydrolysis was modelled with a three-component model to determine the kinetic parameters:

$$\text{At } t < t_B, [\text{Total Pi}] / [\text{myosin heads}] = A + [k_F \cdot t] \quad (1)$$

$$\text{At } t > t_B, [\text{Total Pi}] / [\text{myosin heads}] = A + [k_F \cdot t] + [A + k_F \cdot t_B + k_S \cdot (t - t_B)] \quad (2)$$

where the third component eqn (2) starts when $t > t_B$, $[\text{Total Pi}]/[\text{myosin heads}]$ is the amount of total phosphate determined per myosin head (mol of ATP hydrolysed per mol of myosin heads), A is the amplitude (mol/mol) of the Pi burst, k_F is the rate constant (s⁻¹) of the fast steady state during the unloaded shortening phase in activated conditions, k_S is the rate constant (s⁻¹) of the steady state during 'over-contraction' when the thin filaments of the two halves of the sarcomeres start to overlap each other (a non-physiological state), and t_B is the time break (s) corresponding to the unloaded shortening phase duration (Lionne *et al.* 1996). The model parameters were determined using an iterative process that minimizes the sum of the mean squares between the total phosphate measured and that predicted by the model. The ATP cost of contraction during the unloaded shortening phase was determined based on the number of ATPs consumed per myosin head (ATP_{t_B}) until t_B .

The titration of the myofibril preparation ([active site]), i.e. the number of fully active ATPase sites per total sites, was estimated from the amplitude (A) of the Pi burst as proposed by Iorga *et al.* (2004) for Pi burst experiments on SOL myofibrils. Titration experiments were performed in relaxed conditions because (i) A is similar in relaxed and Ca²⁺-activated conditions, (ii) the cleavage step that controls the Pi burst amplitude occurs in the detached state whatever the condition and (iii) A is determined more accurately in relaxed than in activated conditions, due a slower reaction compared with activated conditions.

The limiting step of the cross-bridge cycle, the isomerization step that occurs just before Pi release (k_4), was evaluated from the catalytic activity (k_{cat}) and the equilibrium constant of the ATP cleavage step (K_3) (Iorga *et al.* 2004):

$$k_4 = k_{\text{cat}} (1 + K_3) / K_3 \quad (3)$$

where $k_{\text{cat}} = k_s/[\text{active site}]$, and $K_3 > 10$.

Stopped-flow experiments

The low temperature retained for the enzyme kinetic experiments allowed measurement of the kinetics of the ATP-induced myosin head detachment from the thin filament and the ATP cleavage (K_3) (Stehle & Brenner, 2000). The experiment was carried out in a Hi-Tech Scientific stopped-flow apparatus (model SF-61 DX2; Hi-Tech Ltd, Salisbury, UK). The excitation wavelength was 295 nm and emission was >320 nm using a cut-off filter (WG320; Hi-Tech) to measure tryptophan fluorescence. For each experimental condition, a series of 12 shots was carried out and averaged. The fluorescence of the myofibrillar solution, without ATP, was set as 100% just before the start of the experiment. Fluorescence time courses were fitted with a double exponential model of rate constants $k_{\text{Trp fast}}$ and $k_{\text{Trp slow}}$. The fast phase is related to the ATP-induced detachment of the myosin head from the actin filaments. Its kinetics is hyperbolically dependent on ATP concentration, and the initial slope of the dependence gives information on the rate of detachment. The slow phase kinetics is governed by the ATP cleavage step and is independent of ATP concentration. For further details, see Stehle and Brenner (2000).

Modelling ATPase activity as a function of twitch fibre type

To identify the changes in ATPase activity due to changes in the twitch fibre type in response to clenbuterol treatment, a multilinear regression analysis including specific ATPases for each twitch fibre type was used:

$$k_i = k_{\text{F-I}} \cdot \text{F-I} + k_{\text{F-IIa}} \cdot \text{F-IIa} + k_{\text{F-IIx/b}} \cdot \text{F-IIx/b} + k_{\text{ssF-I}} \cdot \text{F-I} + k_{\text{ss-IIa}} \cdot \text{F-IIa} + k_{\text{ssF-IIx/b}} \cdot \text{F-IIx/b} \quad (4)$$

where F-I, F-IIa and F-IIx/b were the percentages of twitch fibre types I, IIa and IIx/b, respectively, and k_{ss} was the relaxed ATPase steady state, assumed to be equal to $0.125k_f$.

Ca²⁺-transient measurement

Due to its relatively small size and the technical constraints associated with Ca²⁺-transient measurement, the FDB muscle (fast twitch) was selected, dissected and enzymatically dissociated at 37°C for 1 h with 3 mg ml⁻¹ collagenase (type 1; Sigma, St Louis, MO, USA) dissolved in an external medium (in mM: NaCl 145, KCl 4, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 1, Hepes 10 and glucose 10, pH 7.4). Bundles of fibres were then transferred to an external medium without collagenase, and the fibres were mechanically separated by gentle trituration. Intact single fibres were

Table 1. Time course of clenbuterol-induced phenotype shift in EDL and SOL muscles

		EDL				SOL			
		CTL-G21	CB-G9	CB-G14	CB-G21	CTL-G21	CB-G9	CB-G14	CB-G21
Fibre types (%)	I	7.5 ± 2.2	7.3 ± 2.6	7.6 ± 2.8	5.4 ± 1.4	80.0 ± 7.4	72.0 ± 8.3	69.4 ± 9.5*	60.7 ± 8.5***
	Ila	25.6 ± 1.9	14.7 ± 4.3*	9.9 ± 2.4**	11.0 ± 3.7**	14.8 ± 8.5	16.9 ± 8.4	20.4 ± 9.7	29.1 ± 10**
	IIX-IIb	66.9 ± 2.7	78.0 ± 4.3*	82.4 ± 3.1**	83.6 ± 4.7**	5.3 ± 3.6	11.1 ± 1.8*	10.2 ± 2.8*	10.2 ± 6.8*

Values are mean percentages (± SD, *n* = 8) of the different fibre types in EDL and SOL. *Different from CTL-G21; **different from CTL-G21 and CB-G9; ***different from CTL-G21, CB-G9 and CB-G14. *P* < 0.05. Because non-statistically differences exist between CTL-G9, CTL-G14 and CTL-G21 groups for both fibre type distribution and CSA, results of the CTL-G21 group only are given.

plated on extracellular matrix (Sigma)-coated coverslips attached across a 12 mm hole in the bottom of 35 mm Petri dishes. FDB fibres bathed in an external medium were loaded for 30 min at room temperature with Fluo-3 AM (5 μ M; Teflabs, Austin, TX, USA). Action potential (AP)-induced Ca^{2+} transients were triggered by field stimulation with a single 2 ms pulse just above the stimulation threshold. Fluorescence images were acquired in line-scan mode (spatial [*x*] vs. temporal [*t*], 1.5 ms per line) with a confocal system (Zeiss LSM 510 Meta, 63 \times objective, NA = 1.2, H₂O immersion; Oberkochen, Germany). Fluo-3 was excited with an argon/krypton laser at 488 nm, and the emitted fluorescence was recorded at 525 nm. Single-fibre Ca^{2+} transients were identified on raw fluorescence images. Image strips of the manually identified area of a single fibre were extracted. After subtracting the photomultiplier offset current, strip images were converted to $\Delta F/F$, where *F* is the mean resting fluorescence of the fibre calculated from the image area preceding the AP stimulation and subsequent Ca^{2+} transient. The temporal fluorescence time courses of each fibre were generated by spatial compression of the $\Delta F/F$ images, resulting in a mean spatial *F* value for each temporal coordinate.

Statistics

Variables were compared between groups using ANOVA and the Newman–Keuls *post hoc* multiple comparison procedure when significance was detected. The significance of the model parameters retained in the kinetic analysis was tested by an F-test. Significance was set at *P* < 0.05. All values are expressed as mean ± SEM.

Results

Morphometric properties, shift in muscle phenotype

Clenbuterol treatment for 21 days resulted in significant increases in muscle mass, more pronounced in EDL (+22%; 220.9 ± 5.4 mg CB-G21 vs. 176.3 ± 8.3 CTL-G21; *P* < 0.001) than SOL (+9%; 202.0 ± 5.8 mg CB-G21

vs. 176.7 ± 6.1 mg CTL-G21; *P* < 0.01). The muscle mass/body mass ratio was not different compared with control groups. In the clenbuterol-treated rats, the ratio was unchanged in SOL (0.53 ± 0.01 CB-G21 vs. 0.54 ± 0.01 CTL-G21) but significantly increased in EDL (0.59 ± 0.01 CB-G21 vs. 0.52 ± 0.02 CTL-G21; *P* < 0.001).

Non-statistically significant differences were found between CTL-G9, CTL-G14 and CTL-G21 groups for both fibre type distribution or cross-sectional area (CSA) (data not shown for CTL-G9 and CTL-G14 groups) and thus we decided to present results of the CTL-G21 group only. EDL muscle underwent a phenotypic shift toward faster muscle twitch fibres, as determined by the myosin ATP (Table 1). This shift was noticeable from day 9 onward. The increased percentage of type IIX-IIb twitch fibres at day 9 was accompanied by a decreased percentage of type Ila twitch fibres. At day 21, a 17% (*P* < 0.05) increase and a 15% (*P* < 0.05) decrease in IIX-IIb and Ila twitch fibre types, respectively, were observed compared with CTL-G21. Similar results in the SOL muscle were found (Table 1). At day 14, the proportion of type I muscle fibres was 11% (*P* < 0.05) lower in the treated group compared with CTL-G14 group. The percentage of type IIX-IIb twitch fibres was significantly higher in the treated group compared with CTL-G9 at day 9 (+6%, *P* < 0.01). Later (i.e. between day 9 and day 21), no further increase in the percentage of type IIX-IIb twitch fibres was observed. After 21 days of treatment, the percentage of type Ila fibres was significantly increased from 14 to 29% (Table 1).

Kinetics of muscle force activation and relaxation

Muscle force development. In EDL muscles, maximal isometric tension (*P*₀) exhibited an 89% increase in CB-G21 compared with CTL-G21 (2232 ± 192 vs. 1177 ± 206 mN, respectively; *P* < 0.05, Fig. 2A). However, when *P*₀ was corrected to account for muscle CSA, *sP*₀ was not different in EDL among groups (12.3 ± 1.0 vs. 12.0 ± 1.8 N cm⁻² in CB-G21 and CTL-G21, respectively, Fig. 2A).

In SOL muscle, no significant difference in P_o was observed between CB-G21 and CTL-G21 (1648 ± 133 vs. 1365 ± 50 mN, respectively) (Fig. 2B). However, clenbuterol treatment significantly reduced SOL sP_o in CB-G21 compared with CTL-G21 (11.9 ± 0.7 vs. 14.0 ± 0.6 N cm $^{-2}$; $P < 0.05$, Fig. 2B).

Kinetics of force development and relaxation. Fitting of the kinetics of force activation and relaxation for EDL

and SOL gave high determination coefficients, with a mean r^2 value greater than 0.997 and 95% confidence intervals inferior to 1% for EDL and SOL. Figure 2C and D illustrates representative recordings from fitting curves obtained from G21-CB and CTL-G21 for both EDL and SOL. The results obtained from fitting the muscle mechanical kinetics showing the clenbuterol effect after 21 days of treatment are summarized in Table 2. In EDL, the main clenbuterol effect was observed for k_{ACT} with a significant decrease compared with the untreated

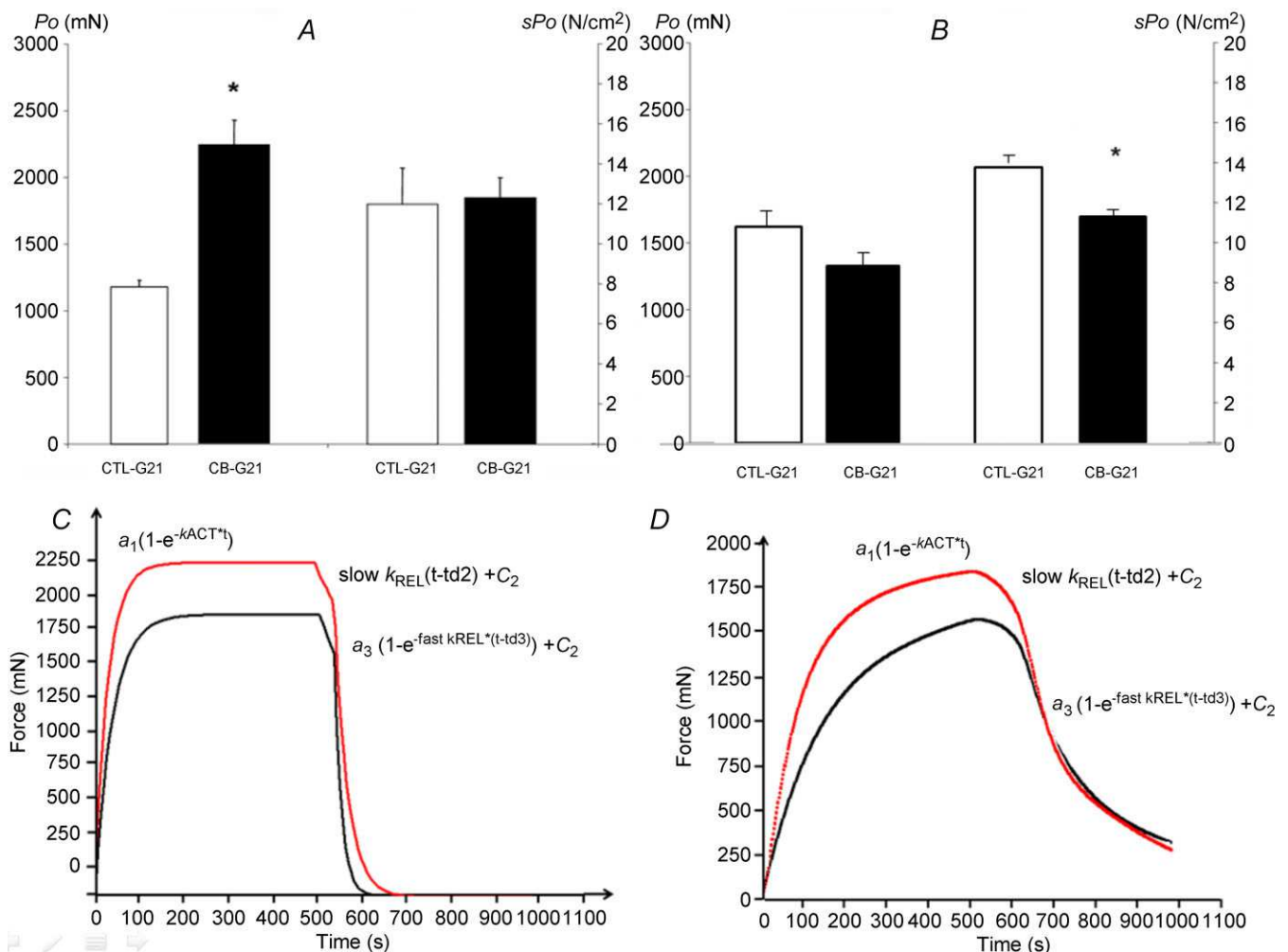


Figure 2. Effect of clenbuterol treatment on maximal isometric tetanic power (P_o), specific isometric tetanic power (sP_o), and force development and force relaxation kinetics in EDL (A, C) and SOL (B, D) muscle

Mean (\pm SEM) EDL (A) and SOL (B) maximal isometric tetanic power (P_o , left vertical axis) and specific maximal isometric tetanic power (sP_o , right vertical axis) recorded from CTL-G21 (white bar) and CB-G21 animals (dark bar). C and D, recording shows representative fitting curves in a CB-treated rat (red line) and a CTL-treated rat (black line) in EDL muscle (C) and SOL muscle (D). The kinetics of force development was described by one exponential increase: $a_1(1-e^{-k_{ACT}t})$, where a_1 is the value of force at the maximal curve asymptote (mN); e is the exponential function; k_{ACT} (s^{-1}) is the rate constant of the force development; and x is the time (ms). The kinetics of force relaxation was described using two exponential slow and fast decays: $a_2(1-e^{-slow\ k_{REL}(t-td2)} + C_2)$ and $a_3(1-e^{-fast\ k_{REL}(t-td3)} + C_2)$ where C_2 and C_3 are the force levels at the beginning of each decay; $slow\ k_{REL}$ and $fast\ k_{REL}$ are the rate constants of slow and fast phases of tension decline, respectively; a_2 and a_3 are the basal relaxation forces level C_2 and C_3 , respectively; and $td2$ and $td3$ are the time delay at the beginning of each decay. * $P < 0.05$ CTL-G21 vs. CB-G21.

Table 2. Clenbuterol alters contraction and relaxation kinetics in fast muscle

	EDL		SOL	
	CTL-G21 (<i>n</i> = 7)	CB-G21 (<i>n</i> = 8)	CTL-G21 (<i>n</i> = 7)	CB-G21 (<i>n</i> = 8)
k_{ACT} (s^{-1})	23.1 ± 0.8	$19.3 \pm 1.2^{**}$	8.5 ± 0.8	7.6 ± 0.0
Slow k_{REL} (s^{-1})	3.4 ± 0.1	$1.8 \pm 0.0^{**}$	1.8 ± 0.2	1.4 ± 0.1
Fast k_{REL} (s^{-1})	38.7 ± 2.2	$28.7 \pm 1.6^{***}$	10.4 ± 1.7	$6.3 \pm 0.5^*$

Kinetic parameters for force development and relaxation during maximal tetanic electrostimulation following clenbuterol treatment in EDL and SOL muscles. Values are expressed as means \pm SEM. k_{ACT} , rate constant of force development; Slow k_{REL} , rate constant of the slow relaxation phase; Fast k_{REL} , rate constant of the fast relaxation phase; CTL-G21, untreated control group; CB-G21, clenbuterol-treated group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

condition (Table 2; $P < 0.01$). In addition, clenbuterol treatment significantly decreased Slow k_{REL} and Fast k_{REL} (Table 2; $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). In SOL muscle, a significant decrease in Fast k_{REL} was observed in CB-21 compared with CTL-G21 (Table 2; $P < 0.05$).

Chemical kinetics

Slow-type muscle. Relaxed condition. A significant increase in myosin ATPase activity was observed during clenbuterol treatment compared with CTL (Figs 3A and 4A, $P < 0.001$) in myofibrils prepared from SOL muscle.

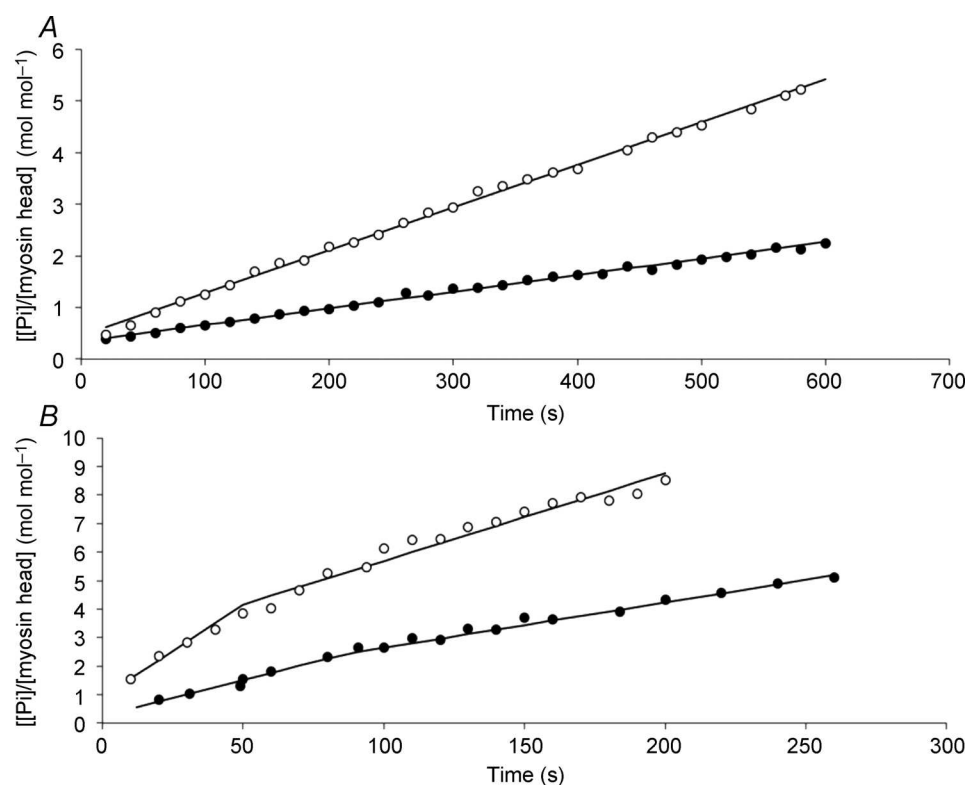


Figure 3. Time courses of SOL myosin ATPase in relaxed (A) or Ca²⁺-activated (B) myofibrils in control group (filled circles), and after 21 days of clenbuterol treatment (open circles)

Reaction mixtures were 3 μM myofibrils (as myosin heads) plus 30 μM [γ -³²P]ATP at 4°C. The reaction mixtures were quenched at the times indicated and the total [³²P]Pi concentrations were determined. In the relaxed condition, the amplitude of Pi burst and ATPase activity were 0.34 ± 0.05 vs. 0.45 ± 0.07 mol mol⁻¹, and 0.0032 ± 0.0005 vs. 0.0083 ± 0.0011 s⁻¹ for the control and 21-day clenbuterol-treated groups, respectively. In the Ca²⁺-activated condition, the slope of the fast linear phase (ATPase activity in unloaded shortening), slope of the slow linear phase, duration of the unloaded shortening phase (dashed lines) and the ATP cost of shortening were 0.025 ± 0.004 vs. 0.065 ± 0.01 s⁻¹, 0.016 ± 0.003 vs. 0.031 ± 0.006 s⁻¹, 87 ± 9 vs. 50 ± 5 s and 2.4 ± 0.2 vs. 4.2 ± 0.4 mol mol⁻¹ for the control (CTL-G21) and 21-day clenbuterol-treated groups (CB-G21), respectively.

This increase was explained by the twitch fibre shift from slow to fast type ($P < 0.001$). The lack of significant change ($P > 0.05$) in the titration index suggests that the number of myosin heads fully competent in the myofibril suspension, from an enzymatic point of view, was

not affected by the clenbuterol treatment. The fast rate constant of the tryptophan fluorescence signal increased and the steeper initial slope of the dependence with ATP concentration ($P < 0.01$; Fig. 4B) indicated an increase in the rate constant of ATP binding-induced myosin

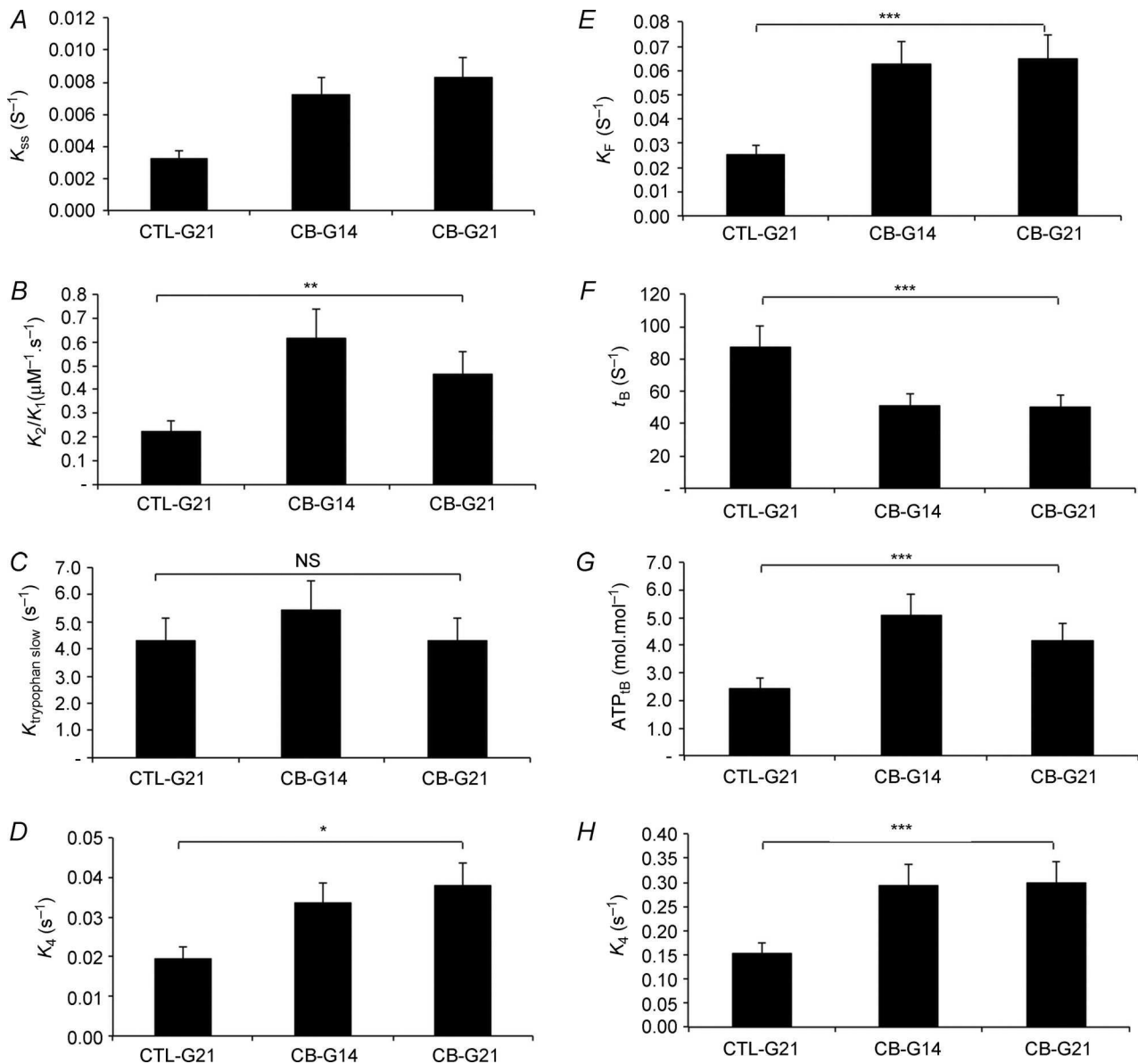


Figure 4. Effect of clenbuterol on SOL myofibrillar ATPase activity in relaxed (A–E) and Ca^{2+} -activated (F–H) conditions at 4°C

Reaction mixture concentrations were 3 and 30 μM for myosin heads and [γ - ^{32}P]ATP concentrations in Rapid Flow Quench experiments, respectively. In Stopped-Flow experiments (B and C), myosin head concentration was 1 μM reaction mixture, and ATP concentrations ranged from 30 μM to 1 mM. CTL-G21, control group; CB-G14, 14-day clenbuterol-treated group; CB-G21, 21-day clenbuterol-treated group; k_{ss} , rate constant of the steady-state phase in relaxed condition; k_2/k_1 , ATP binding-induced myosin detachment obtained from the initial slope of the regression of $k_{tryptophan\ fast}$ as a function ATP concentration; $k_{tryptophan\ slow}$, rate constant observed for the slow phase of tryptophan increase when mixing myofibrils with ATP; k_4 , rate constant of Pi release (the isomerization step preceding diffusion of Pi); k_F , rate constant of the fast steady-state phase in activated condition; t_B , duration of the unloaded shortening phase, an index of unloaded shortening velocity; ATP_B, ATP consumed during the unloaded shortening phase. Because no significant difference was detected between CTL-G9, CTL-G14 and CTL-G21 groups, results of the CTL-G21 group are presented. NS, not significant. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

detachment with clenbuterol treatment compared with the control group. In contrast, the rate constant of the tryptophan fluorescence slow phase was not altered by clenbuterol treatment ($P > 0.05$; Fig. 4C). As this slow phase was attributed to the ATP cleavage step (Stehle & Brenner, 2000), the present result suggests a lack of clenbuterol effect on this ATP cleavage step. The increase in the rate constant of Pi release under clenbuterol treatment ($P < 0.001$; Fig. 4D) suggests that the enhancement in relaxed ATPase activity was due to an increase in the Pi release step, a rate-limiting step in the steady state of ATPase activity.

Ca²⁺-activated condition. In this condition and over the present time scale, the time curve was biphasic (Fig. 3B). The fast steady state corresponds to the unloaded shortening phase (Lionne *et al.* 1996). During this phase, myofibrils were shortened at maximal velocity in the unloaded condition. The slow steady state corresponds to a pseudo-isometric phase (non-physiological phase). The time corresponding to the transition between these two phases is the duration of the unloaded shortening (t_B). A significant increase in the slope of the fast steady state (i.e. myosin ATPase activity) was observed under clenbuterol treatment in activated SOL myofibrils compared with controls ($P < 0.001$; Fig. 4E). In association with this increase, a shorter duration of the unloaded phase was noted ($P < 0.001$; Fig. 4F), suggesting an increase in unloaded shortening velocity. Interestingly,

the amount of ATP hydrolysed during the unloaded shortening phase increased under clenbuterol treatment (Fig. 4G; $P < 0.001$). Similarly to the relaxed condition, an increase ($P < 0.001$) in Pi release rate was also noted in the Ca²⁺-activated condition, suggesting that the increased myofibrillar ATPase was due to an increase in the rate constant of Pi release. The multilinear regression analysis revealed that the increases in the Pi release rate constant and myofibrillar ATPase activity in SOL were mainly explained ($P < 0.001$) by the phenotype shift induced by clenbuterol.

Fast-type muscle. No significant change was seen in myofibrillar ATPase activity (Fig. 5) in myofibrils prepared from EDL muscle. The rate constant of the fast and slow steady-state phases (Fig. 5A and B, respectively), the duration of the unloaded shortening phase (Fig. 5C) and the amount of ATP consumed during this shortening (Fig. 5D) were not modified by clenbuterol treatment. The multilinear regression analysis revealed that the increase in the Pi release rate constant and myofibrillar ATPase activity in EDL were not significantly explained by the phenotype shift induced by clenbuterol.

Ca²⁺ transients

The action potential-elicited Ca²⁺ transients in field-stimulated intact FDB twitch fibres from the clenbuterol-treated animals showed a progressively

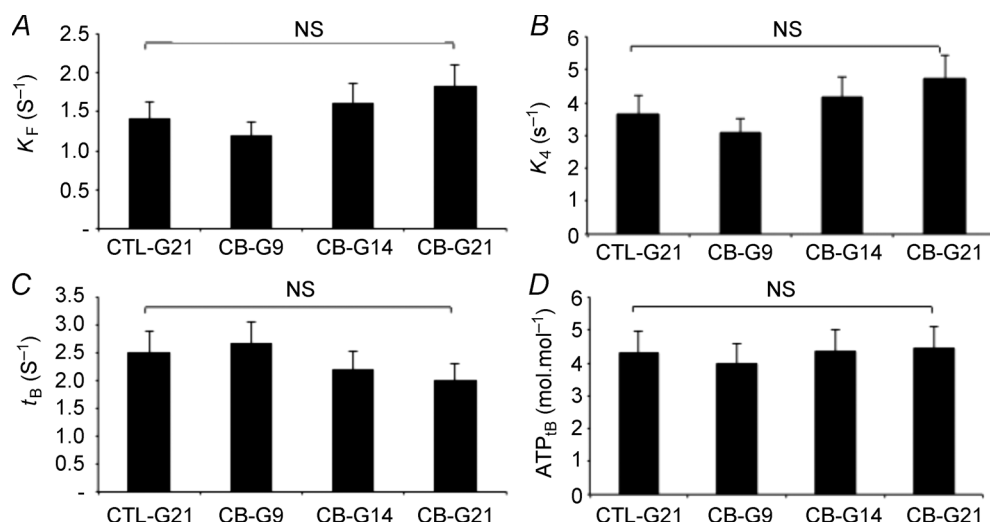


Figure 5. Effect of clenbuterol on EDL myofibrillar ATPase activity in Ca²⁺-activated conditions at 4°C. Reaction mixture concentrations were 3 and 30 μ M for myosin heads and [γ -³²P]ATP concentrations in Rapid Flow Quench experiments, respectively. CTL-G21, control group; CB-G9, 9-day clenbuterol-treated group; CB-G14, 14-day clenbuterol-treated group; CB-G21, 21-day clenbuterol-treated group; k_4 , rate constant of Pi release (the isomerization step preceding diffusion of Pi); k_F , rate constant of the fast steady-state phase in activated condition; t_B , duration of the unloaded shortening phase, an index of unloaded shortening velocity; ATP_B, ATP consumed during the unloaded shortening phase. Because no significant difference was detected between CTL-G9, CTL-G14 and CTL-G21 groups, results of the CTL-G21 group are presented. NS, not significant.

decreased amplitude after 14 days (-19% , $P < 0.01$) and 21 days (-25% , $P < 0.01$), but not after 9 days, when compared with the control groups (Fig. 6).

Discussion

In this study, we showed that chronic clenbuterol administration induced a strong side effect, in contrast to the positive functional effect associated with muscle hypertrophy and absolute maximal tetanic force (P_0). In agreement with the study of Head & Ha (2011) showing that clenbuterol treatment induces a loss in force production, we demonstrated that this loss is linked to (i) a diminution of the contraction and relaxation kinetics during muscle force generation, especially in fast-type muscle, and (ii) calcium handling.

Chronic clenbuterol treatment leads to hypertrophy but reduced specific force in slow twitch muscle

We confirmed previous studies showing that chronic clenbuterol administration increases both muscle mass and absolute isometric force, especially in fast-type muscle (Mounier *et al.* 2007). In the present study, the 89% increase in EDL absolute P_0 in clenbuterol-treated rats ($4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$) is greater than the 31% increase found by Zeman *et al.* (1988) for the same duration of treatment with rats receiving about $1.6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ or the 20% increase in maximal isometric force in the study of Ryall *et al.* (2002) with the commonly used dose of $2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$. Thus, it seems that a dose-response effect exists between clenbuterol and the related increase in maximal tetanic force for treatment lasting at least 2–4 weeks (Zeman *et al.* 1988; Ryall *et al.* 2002). Moreover at the dose of $1.6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ it seems that no further increase in type II fibre CSA or P_0 occurs in EDL muscle between 2 and 12 weeks of treatment (Zeman

et al. 1988). Nevertheless, when normalized to CSA, the maximal tetanic force was unchanged and even depressed in slow twitch muscle. Moreover, it is well known that high dose clenbuterol administration, as in our study, causes inflammation and apoptonecrosis in muscle early on in the treatment and that these effects seem to be greater in slow twitch fibres (Burniston *et al.* 2005; Douillard *et al.* 2011). This could be due to higher β_2 -adrenoreceptor and protein G α s subunit density in slow-type as opposed to fast-type muscles (Martin *et al.* 1989). The main consequences of the apoptonecrotic period could be delayed muscle growth and an increased number of infiltrated cells and damaged fibres. Thus, these transient deleterious effects might explain the subsequent decrease in the maximal tetanic contraction obtained at 9, 14 and 21 days in SOL and, to a lesser extent, the decrease in the maximal tetanic contraction obtained at 14 days in EDL.

Clenbuterol treatment did not increase specific myofibrillar ATPase activity

Our results show that the myofibrillar ATPase activities and the content of type II twitch fibres increased in the same proportion in slow twitch muscle during clenbuterol treatment, indicating that the ATPase activity associated with each twitch fibre type was not altered. This suggests that the depressed specific tension was not due to the contractile machinery itself. Two myofilament proteins are possibly phosphorylated in response to β -adrenoceptor activation, i.e. troponin-I, which reduces the affinity for Ca^{2+} binding to troponin-C, and myosin binding protein-C (C-protein), which increases the maximal myosin ATPase rate, although neither protein seems phosphorylated in mammalian skeletal muscle under β -adrenergic agonist treatment (Manning & Stull, 1982; Gruen *et al.* 1999). The amino acid residues that are phosphorylated by protein kinase A in cardiac troponin-I or C-protein are absent from the skeletal muscle isoforms of these proteins (Shaffer & Gillis, 2010). Another protein, myosin light-chain kinase, is phosphorylated under β -agonist treatment in smooth muscle, but again this does not occur in skeletal muscle (Manning & Stull, 1982). β -Agonists such as clenbuterol seem to have no notable ergogenic effect on myosin head function in skeletal muscle, except for the well-known change in twitch fibre type.

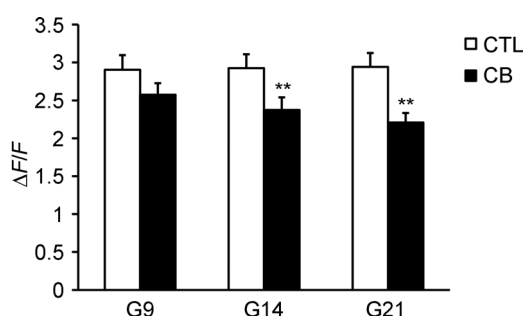


Figure 6. Effect of clenbuterol treatment on FDB Ca^{2+} transient amplitude

Bar graphs comparing amplitude for single-fibre AP-elicited Ca^{2+} transients in FDB fibres of control (CTL; $n = 7$) or clenbuterol-treated (CB; $n = 8$) rats after 9, 14 and 21 days of treatment. Amplitude was calculated from individual exponential fits and averaged. ** $P < 0.01$.

Calcium handling is altered under chronic clenbuterol treatment

Another explanation is that the loss of force production induced by clenbuterol reflects different aspects of problems in calcium handling.

We found an alteration in the calcium handling ability in fast-type muscle with a reduction in Ca^{2+} -transient amplitude that may explain, at least in part, the reduced kinetics of muscle contraction. Sarcolemma Ca^{2+} current and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} handling are altered differently during acute β_2 -agonist administration compared with chronic administration. The earlier demonstration that acute β_2 -agonists influence intracellular Ca^{2+} handling in intact skeletal muscle was achieved by administering terbutaline to isolated fast twitch FDB fibres from mice (Cairns & Dulhunty, 1993). These authors found a potentiation of myoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ response ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) during tetanic stimulation (20–100 Hz), especially at high stimulation frequencies. A series of subsequent studies further highlighted the acute β_2 -agonist-induced augmentation in peak twitch or tetanic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ on skeletal muscles for doses ranging from 1 to 50 μM (Bruton *et al.* 1996; Ha *et al.* 1999; Prakash *et al.* 1999). Overall, β_2 -agonists do not change the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in rodent muscles (Prakash *et al.* 1999). A recent study by Rudolf *et al.* (2006) showed that isoprenaline (10 μM) facilitated emptying of Ca^{2+} from the lumen of the sarcoplasmic reticulum of mouse tibialis anterior muscle *in vivo* and that this effect was greater with tetanic stimulation. This strongly suggests that the increased amplitude of Ca^{2+} transients involves greater Ca^{2+} efflux from the sarcoplasmic reticulum. However, data on the effect of chronic β_2 -agonist treatment on skeletal muscle calcium homeostasis are sparse (Sirvent *et al.* 2014). In this study, high-dose chronic clenbuterol treatment had a deleterious effect given that Ca^{2+} -transient amplitudes were decreased. Although we do not understand the precise mechanisms that would explain why chronic clenbuterol treatment has the opposite effect on Ca^{2+} handling compared with that usually reported for acute treatment, the observations by Burniston *et al.* (2005) and Douillard *et al.* (2011) suggest some directions for investigation. First, chronic high doses (4 mg kg⁻¹ day⁻¹) of clenbuterol induce transient apoptosis and necrosis in fast skeletal muscle. In addition, Lavoie *et al.* (2002) used the same dose and observed a decrease of 45 and 40% in β_2 -adrenoreceptor density in SOL and gastrocnemius muscle, respectively.

Chronic clenbuterol treatment alters contraction and relaxation kinetics

Beyond the specific maximal force, the original results of our study were related to the changes in muscle contraction and relaxation kinetics induced by clenbuterol. Indeed, our data demonstrated altered contraction and relaxation kinetics during muscle force generation, especially in EDL, with significant decreases in k_{ACT} , Slow k_{REL} and Fast k_{REL} . Regarding contraction development, k_{ACT} depends

on both the cross-bridge isomerization rate constant (dependent on Pi liberation) and the Ca^{2+} release velocity (i.e. Ca^{2+} transient). In EDL, our results do not provide evidence for the first mechanism because myosin k_4 and ATPase activity did not change under clenbuterol treatment. However, we showed a reduction in the muscle Ca^{2+} transient of FDB muscle that approximates the EDL muscle fast phenotype (Fig. 6). This could contribute to the reduced kinetics of muscle contraction and strongly suggests that clenbuterol acts on some of the processes involved in excitation–contraction coupling, thereby modulating force and contractility characteristics, probably via an alteration in calcium handling. It has been well documented that muscle contraction efficiency and resistance to fatigue are altered by clenbuterol treatment (Chen & Alway, 2001; Polla *et al.* 2001). Interestingly, based on the fitting kinetics, we found altered muscle relaxation after treatment. Slow k_{REL} was dependent on the myosin head detachment rate constant and the velocity of calcium uptake, confirming the role of calcium handling ability in the alteration of the relaxation properties of skeletal muscle. In our study, the mechanism responsible for the decreased relaxation rate in EDL induced by any alteration of the myosin head detachment kinetics can be ruled out because of the lack of significant change in the ATP binding rate constant. The slowed time course of skeletal muscle contraction and relaxation that clenbuterol induced during force generation counterbalanced the positive effects associated with skeletal muscle hypertrophy and may have functional relevance for physical activities. As the rate constants of both force development and relaxation control the maximal shortening velocity, such treatment could be considered as having a negative impact on the activities of daily living. On the one hand, slowing muscle relaxation might be associated with altered agonist–antagonist coordination but, on the other, a reduced myosin head detachment rate would be associated with reduced maximal shortening velocity. Another potentially negative effect for slow twitch muscle lies in the increased ATP cost of shortening, suggesting an altered efficiency in mechanochemical transduction, which would explain, at least in part, the lower resistance to fatigue observed with high doses (He *et al.* 2000). These last negative effects are of particular importance in sports where performance depends on endurance and muscle oxidative capacity. However, even with altered contraction and relaxation kinetics, there remains the increase in absolute tetanic force that could confer to athletes the expected ergogenic aid.

In conclusion, our study shows that chronic clenbuterol treatment decreases skeletal muscle contraction and relaxation kinetics, especially in fast-type muscle, and an increase in the ATP cost for contraction was noted, as well. Because we found a decreased Ca^{2+} -transient amplitude, it seems that the reduced specific force

production or the increased fatigue was dependent on depressed calcium homeostasis induced by clenbuterol. The beneficial anabolic effects of high-dose β_2 -agonists for treatment of sarcopenia, muscle weakness and muscular dystrophy seem counterbalanced, at least in part, by deleterious effects on muscle contractility, relaxation kinetics and Ca^{2+} handling.

References

- Barman TE & Travers F (1985). The rapid-flow-quench method in the study of fast reactions in biochemistry: extension to subzero conditions. *Methods Biochem Anal* **31**, 1–59.
- Bricout V-A, Serrurier BD & Bigard AX (2004). Clenbuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles. *Acta Physiol Scand* **180**, 271–280.
- Brooke MH & Kaiser KK (1970). Three human myosin ATPase systems and their importance in muscle pathology. *Neurology* **20**, 404–405.
- Brooks SV & Faulkner JA (1988). Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. *J Physiol* **404**, 71–82.
- Bruton JD, Lännergren J & Westerblad H (1996). Effects of repetitive tetanic stimulation at long intervals on excitation–contraction coupling in frog skeletal muscle. *J Physiol* **495**, 15–22.
- Burniston JG, Chester N, Clark WA, Tan L-B & Goldspink DF (2005). Dose-dependent apoptotic and necrotic myocyte death induced by the β_2 -adrenergic receptor agonist, clenbuterol. *Muscle Nerve* **32**, 767–774.
- Cairns SP & Dulhunty AF (1993). Beta-adrenergic potentiation of E-C coupling increases force in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve* **16**, 1317–1325.
- Candau R, Iorga B, Travers F, Barman T & Lionne C (2003). At physiological temperatures the ATPase rates of shortening soleus and psoas myofibrils are similar. *Biophys J* **85**, 3132–3141.
- Chen KD & Alway SE (2001). Clenbuterol reduces soleus muscle fatigue during disuse in aged rats. *Muscle Nerve* **24**, 211–222.
- Collomp K, LePanse B, Portier H, Lecoq A-M, Jaffre C, Beaupied H, Richard O, Benhamou L, Courteix D & DeCaurriz J (2005). Effects of acute salbutamol intake during a Wingate test. *Int J Sports Med* **26**, 513–517.
- Dodd SL, Powers SK, Vrabas IS, Criswell D, Stetson S & Hussain R (1996). Effects of clenbuterol on contractile and biochemical properties of skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* **28**, 669–676.
- Douillard A, Galbes O, Rossano B, Vernus B, Bonniieu A, Candau R & Py G (2011). Time course in calpain activity and autolysis in slow and fast skeletal muscle during clenbuterol treatment. *Can J Physiol Pharmacol* **89**, 117–125.
- Gruen M, Prinz H & Gautel M (1999). cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on–off fashion. *FEBS Lett* **453**, 254–259.
- Ha TN, Posterino GS & Fryer MW (1999). Effects of terbutaline on force and intracellular calcium in slow-twitch skeletal muscle fibres of the rat. *Br J Pharmacol* **126**, 1717–1724.
- He ZH, Bottinelli R, Pellegrino MA, Ferenczi MA & Reggiani C (2000). ATP consumption and efficiency of human single muscle fibers with different myosin isoform composition. *Biophys J* **79**, 945–961.
- Head SI & Ha TNV (2011). Acute inhibitory effects of clenbuterol on force, Ca^{2+} transients and action potentials in rat soleus may not involve the β_2 -adrenoceptor pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **38**, 638–646.
- Herrmann C, Lionne C, Travers F & Barman T (1994). Correlation of ActoS1, myofibrillar, and muscle fiber ATPases. *Biochemistry (Mosc)* **33**, 4148–4154.
- Hostrup M, Kalsen A, Auchenberg M, Bangsbo J & Backer V (2014a). Effects of acute and 2-week administration of oral salbutamol on exercise performance and muscle strength in athletes. *Scand J Med Sci Sports*; DOI: 10.1111/sms.12298.
- Hostrup M, Kalsen A, Bangsbo J, Hemmersbach P, Karlsson S & Backer V (2014b). High-dose inhaled terbutaline increases muscle strength and enhances maximal sprint performance in trained men. *Eur J Appl Physiol* **114**, 2499–2508.
- Houadjeto M, Travers F & Barman T (1992). Ca^{2+} -activated myofibrillar ATPase: transient kinetics and the titration of its active sites. *Biochemistry (Mosc)* **31**, 1564–1569.
- Iorga B, Candau R, Travers F, Barman T & Lionne C (2004). Does phosphate release limit the ATPases of soleus myofibrils? Evidence that (A)M. ADP.Pi states predominate on the cross-bridge cycle. *J Muscle Res Cell Motil* **25**, 367–378.
- Kim YS, Sainz RD, Summers RJ & Molenaar P (1992). Cimaterol reduces β -adrenergic receptor density in rat skeletal muscles. *J Anim Sci* **70**, 115–122.
- Kissel JT, McDermott MP, Mendell JR, King WM, Pandya S, Griggs RC, Tawil R & FSH-DY Group (2001). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of albuterol in facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology* **57**, 1434–1440.
- Lavoie JL, Calderone A & Béliveau L (2002). A farnesyltransferase inhibitor attenuated β -adrenergic receptor downregulation in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282**, R317–R322.
- Lionne C, Travers F & Barman T (1996). Mechanochemical coupling in muscle: attempts to measure simultaneously shortening and ATPase rates in myofibrils. *Biophys J* **70**, 887–895.
- Lynch GS, Hinkle RT, Chamberlain JS, Brooks SV & Faulkner JA (2001). Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6–28 months old. *J Physiol* **535**, 591–600.
- Lynch GS & Ryall JG (2008). Role of β -adrenoceptor signalling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev* **88**, 729–767.
- Manning DR & Stull JT (1982). Myosin light chain phosphorylation–dephosphorylation in mammalian skeletal muscle. *Am J Physiol* **242**, C234–C241.
- Martin WH, Coggan AR, Spina RJ & Saffitz JE (1989). Effects of fiber type and training on β -adrenoceptor density in human skeletal muscle. *Am J Physiol* **257**, E736–E742.

- McCormick C, Alexandre L, Thompson J & Mutungi G (2010). Clenbuterol and formoterol decrease force production in isolated intact mouse skeletal muscle fiber bundles through a β_2 -adrenoceptor-independent mechanism. *J Appl Physiol* **109**, 1716–1727.
- Mersmann HJ (1998). Overview of the effects of β -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J Anim Sci* **76**, 160–172.
- Mounier R, Cavalié H, Lac G & Clottes E (2007). Molecular impact of clenbuterol and isometric strength training on rat EDL muscles. *Pflügers Arch* **453**, 497–507.
- Poggesi C, Tesi C & Stehle R (2005). Sarcomeric determinants of striated muscle relaxation kinetics. *Pflügers Arch* **449**, 505–517.
- Polla B, Cappelli V, Morello F, Pellegrino MA, Boschi F, Pastoris O & Reggiani C (2001). Effects of the β_2 -agonist clenbuterol on respiratory and limb muscles of weaning rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R862–R869.
- Prakash YS, vander Heijden HF, Gallant EM & Sieck GC (1999). Effect of β -adrenoceptor activation on $[Ca^{2+}]_i$ regulation in murine skeletal myotubes. *Am J Physiol* **276**, C1038–C1045.
- Reimann EM & Umfleet RA (1978). Selective precipitation of ^{32}P i onto filter papers. Application to ATPase and cyclic AMP phosphodiesterase determination. *Biochim Biophys Acta* **523**, 516–521.
- Ricart-Firinga C, Stevens L, Canu MH, Nemirovskaya TL & Mounier Y (2000). Effects of β_2 -agonist clenbuterol on biochemical and contractile properties of unloaded soleus fibers of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C582–C588.
- Rudolf R, Magalhães PJ & Pozzan T (2006). Direct *in vivo* monitoring of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} and cytosolic cAMP dynamics in mouse skeletal muscle. *J Cell Biol* **173**, 187–193.
- Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN & Lynch GS (2002). β_2 -Agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, R1386–R1394.
- Sanchez AMJ, Collomp K, Carra J, Borrani F, Coste O, Préfaut C & Candau R (2012). Effect of acute and short-term oral salbutamol treatments on maximal power output in non-asthmatic athletes. *Eur J Appl Physiol* **112**, 3251–3258.
- Shaffer JF & Gillis TE (2010). Evolution of the regulatory control of vertebrate striated muscle: the roles of troponin I and myosin binding protein-C. *Physiol Genomics* **42**, 406–419.
- Sirvent P, Douillard A, Galbes O, Ramonatxo C, Py G, Candau R & Lacampagne A (2014). Effects of chronic administration of clenbuterol on contractile properties and calcium homeostasis in rat extensor digitorum longus muscle. *PloS One* **9**, e100281.
- Stehle R & Brenner B (2000). Cross-bridge attachment during high-speed active shortening of skinned fibers of the rabbit psoas muscle: implications for cross-bridge action during maximum velocity of filament sliding. *Biophys J* **78**, 1458–1473.
- Zeman RJ, Ludemann R, Easton TG & Etlinger JD (1988). Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a β_2 -receptor agonist. *Am J Physiol* **254**, E726–E732.

Additional information

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contributions

Conception and design of the experiments: G.P. and R.C.; collection, analysis and interpretation of data: G.P., C.R., R.C., P.S., A.M.J.S., A.G.P., A.D., O.G., C.L., A.B., A.C., O.C. and A.L.; drafting the article or critically revising it for substantial intellectual content: C.R., R.C., G.P., A.M.J.S., A.G.P. and A.C.

Funding

This work was supported by the World Anti-Doping Agency, the Centre National d'Etudes Spaciales, the French Ministry of Youth and Sports, and the Fondation Française des Jeux, and it was funded in part by the University of Montpellier and the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). A.M.J.S., A.D. and A.G.P. received PhD scholarships from the Ministère de l'Enseignement la Recherche et de la Technologie (MENRT).

Evolution des modèles empiriques des effets de l'entraînement vers une structure physiologique

PHILIPPE A.G.^{1*}, BORRANI F.², BEGUE G.¹, BONNIEU A.¹. et CANDAU R.B.^{1*}.

¹Université de Montpellier, INRA, UMR866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, F-34060, Montpellier, France

² Institute of Sport Sciences and Department of Physiology, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland

*Correspondent. Email: antony.philippe@umontpellier.fr; robin.candau@umontpellier.fr

Introduction

La théorie des systèmes a été appliquée pour décrire les effets de l'entraînement sur la performance physique [1–3]. Le sujet, athlète [2] ou animal [4] est assimilé à un système qui produit une performance (sortie du système) en réponse à une stimulation *i.e.* une charge de travail (entrée du système). Le modèle de Banister classiquement utilisé inclut deux composantes afin de distinguer les adaptations positives et la fatigue générées toutes deux par l'entraînement [3]. Plus récemment, il a été montré qu'un modèle composé d'une seule fonction de transfert (*i.e.* aptitude) était suffisant pour suivre la performance auprès de sujets entraînés en endurance sur bicyclettes ergométriques et en laboratoire [5]. Un modèle plus complexe à dose-réponses variables, dans lequel la réponse à une charge de travail dépend des charges précédentes a permis de mieux comprendre les effets de l'entraînement [6], et notamment de progresser dans le domaine de la simulation de stratégies d'entraînement avec périodes de surcharge et d'affutage afin d'optimiser la performance [7–9]. Cependant, ce modèle demeure lui aussi essentiellement à caractère empirique dans la mesure où la signification biologique de ses composants reste encore à être établie. Ce type de modèle suppose que la réponse à une charge travail est de type impulsionnelle (figure 1), puis décroît selon une loi exponentielle : $g(t) = k.e^{-t/\tau}$ où k est une constante d'amplitude et τ une constante de temps décrivant la vitesse de décroissance de la réponse impulsionnelle (à $t = 4 \tau$, $g(t)$ est diminué de 98%). Cependant, lorsque le muscle strié est sollicité lors d'un entraînement en

force ou en résistance par exemple, ces derniers ne s'adaptent pas instantanément mais progressivement. Cette adaptation est le résultat d'un remodelage qui s'exprime à la fois à l'échelle macroscopique, dirigé essentiellement par des changements phénotypiques et par un déséquilibre de la balance protéique, ainsi qu'à l'échelle microscopique et qualitatif porté par une adaptation de la tension spécifique (P_0/CSA), de la vitesse de raccourcissement des fibres (V_0) ou de l'activité ATPasique elle-même. Après 10 semaines d'entraînement en résistance de type escalade avec charges additionnelles, une hypertrophie de tous les isoformes de fibres musculaires a été observée [10]. Cette hypertrophie est accompagnée de changements phénotypiques en faveur des fibres intermédiaires de type 2A [11], et parfois d'une augmentation de la V_0 de ces mêmes fibres [12].

Cette réalité des adaptations à l'entraînement en résistance nous indique que la réponse à une charge de travail n'est pas de type impulsionnelle c'est à dire instantanée à l'issue de la séance d'entraînement, mais qu'elle se met progressivement en place sur un laps de temps de plusieurs jours. De façon générale, les processus biologiques répondent typiquement selon une cinétique exponentielle. Il semble en être de même pour le muscle strié squelettique. Ainsi la réponse des transcrits aux charges d'entraînement est de nature exponentielle [13] et l'hypertrophie induite ne survient que progressivement elle aussi [10].

L'objectif de cette étude est donc de formuler un modèle qui soit de nature à décrire une réponse à l'entraînement non pas de type impulsionnelle, mais de nature exponentielle et apte à prendre en considération le temps nécessaire à la mise en place des mécanismes adaptatifs du tissu musculaire (figure 1). Le modèle classique des effets de l'entraînement et ses dérivés possèdent une structure parallèle du fait de la structure similaire des deux fonctions de transfert impulsionnelles antagonistes (*i.e.* aptitude et fatigue) qui varient ensemble en parallèle tout au long de la période étudiée [2]. A l'opposé, la description des adaptations biologiques qui surviennent en réponse à un stimulus requiert un modèle sériel dans la mesure où la phase de croissance exponentielle est suivie d'une décroissance vers l'état initial d'homéostasie en l'absence de nouvelle stimulation. Cette phase de décroissance correspond dans notre cas à une période de désentraînement. Ainsi, la nouvelle structure mathématique proposée comporte deux phases exponentielles bien distinctes qui se succèdent l'une à l'autre. Sur cette base, deux nouvelles formulations de modèles ont été testées : (1) un modèle A_{pt} à simple fonction de transfert bi-exponentielle en série pour décrire la dynamique des adaptations au sein du muscle strié squelettique, et (2) un modèle $A_{pt}F$ similaire à A_{pt} auquel a été ajouté à la fonction d'aptitude bi-exponentielle, une simple fonction impulsionnelle négative décrivant la fatigue. La fatigue étant quant à elle maximale immédiatement à l'arrêt

de la séquence d'entraînement. Dans ce contexte, le but de la présente étude était de comparer ces deux modèles à complexité croissante à celui classique de Banister, sur la base des données issues de 15 rongeurs entraînés en résistance selon le modèle d'escalade décrit précédemment [4].

Méthode

Animal, protocole d'entraînement et quantification des charges et performances.

Les données utilisées pour cette étude sont issues de l'étude 3. Brièvement, 15 rats Wistar Han âgés de 8 semaines ont suivi l'entraînement durant 4 semaines. Les animaux étaient élevés à température et humidité constantes et maintenus dans un cycle jour-nuit 12 :12 h. Ils avaient accès à une nourriture standard et à de l'eau *ad libidum*. Après 3 jours de familiarisation, les rats étaient entraînés selon un protocole d'entraînement résistance de type d'escalade avec charges additionnelles. Les animaux devaient grimper une grille inclinée à 85° selon le protocole de de Lee et al. ici adapté à notre objectif de gains marqués de performance [14]. Des charges additionnelles étaient attachées à la base de la queue des animaux. Le poids initial était fixé à 50% de leur poids de corps et incrémenté progressivement pour atteindre 150% de leur poids de corps à l'issue des 4 semaines d'entraînement [4,10]. La séance d'entraînement consiste en une série de 10 répétitions espacées chacune par 2 minutes de repos à raison de 5 séances par semaine, pendant l'après midi. L'entraînement était arrêté si l'animal refusait de grimper malgré les sollicitations de l'expérimentateur. Tous les animaux ont terminé l'entraînement sans difficulté notable.

Quantification des charges et performances

La performance était appréciée au travers du travail potentiel fourni contre la force due à la gravité (W en J):

$$W = (m_{\text{charge}} + m_{\text{rat}}) \cdot g \cdot \Delta h \cdot N$$

Où la masse (m) est exprimée en kg, g est l'accélération due à la gravité exprimée en m.s^{-2} , Δh est la distance grimpée en m, et N est le nombre de répétitions (*i.e.* $N = 10$).

La performance était quantifiée au travers de la puissance développée avec les charges additionnelles (W' en W) en prenant en compte le travail fourni et le temps d'escalade :

$$W'_i = W_i \cdot t^{-1}$$

Où t est le temps de montée en seconde. Chaque répétition durait entre 3 et 25 secondes, en fonction de la charge soulevée par les rats et de leur degré d'aptitude. Afin de prendre en compte la relation caractéristique parabolique qui existe entre la puissance et la charge, les puissances ont été exprimées en équivalent puissance optimale. La relation entre la puissance et la charge établie par Izquierdo et al. [15] a été utilisée :

$$W'_{iz} = -0,14 W\%^2 + 16,33 W\% + 12,49$$

Où le terme $W\%$ représente charge exprimée en % de la charge maximale.

Au final, la performance réelle exprimée en équivalent puissance à charge optimale dépend de la puissance mesurée au jour i (W'_i) pondérée par un facteur d'équivalence noté U :

$$Perf_{réelle,i} = W'_i + U$$

$$\text{Où } U = \frac{W'_i \cdot Fc}{100} \text{ avec } Fc, \text{ un facteur correctif égal à } Fc = \frac{(W'_{iz,opt} - W'_{iz,i})}{W'_{iz,opt}} \cdot 100$$

Où $W'_{iz,opt}$ est la valeur maximale de W'_{iz}

Modélisation des effets de l'entraînement

Un système est déterminé par au moins une fonction de transfert $H(t, \theta)$ reliant son entrée à sa sortie. Les paramètres du modèle caractérisant la réponse à l'entraînement du sujet (noté θ) sont estimés par l'ajustement de la sortie du modèle (i.e. performance modèle) à la performance réelle. La fonction de transfert $H(t, \theta)$ donne la performance modèle au temps t par le produit de convolution :

$$p(t) = p_0 + w(t) * H(t, \theta)$$

Où p_0 est la performance initiale, $W(t)$ est la charge de travail et $*$ le produit de convolution.

Le produit de convolution est défini par l'intégrale :

$$w(t) * H(t, \theta) = \int_0^t w(s) \cdot H(t - s, \theta) ds$$

La discrétisation de l'intégrale permet de quantifier la performance modèle en fonction des charges d'entraînement :

$$p(n\Delta t) = p_0 + \sum_{i=1}^{n-1} w(i\Delta t) \cdot H((n - i)\Delta t, \theta)$$

Où $t = n\Delta t$ et $w(0)$ prennent les valeurs de 0, et Δt est fixé à 1 jour.

Selon le modèle de Banister, la performance est définie par la différence entre les fonctions impulsionnelles d'aptitude et de fatigue qui évoluent en parallèle :

$$\hat{p}_n = p_0 + \sum_{i=1}^{n-1} k_A w_{i-1} e^{-\frac{(n-i)}{\tau_A}} - \sum_{i=1}^{n-1} k_F w_{i-1} e^{-\frac{(n-i)}{\tau_F}}$$

Où \hat{p}_n est la performance modèle au jour n, w_i représente les charges successives avec i variant du jour 1 à n-1, k_A , k_F , sont les constantes d'amplitude et τ_A et τ_F sont les constantes de temps de décroissance pour l'aptitude et la fatigue, respectivement.

Selon le modèle A_{pt} , la performance est définie par une fonction bi-exponentielle sérielle d'aptitude:

$$\hat{p}_n = p_0 + \sum_{i=1}^{n-1} k_A w_{i-1} (1 - e^{-\frac{(n-i)}{\tau_{A1}}}) \cdot U + \sum_{i=1}^{n-1} k_A w_{i-1} e^{-\frac{(n-i)-TD}{\tau_{A2}}} \cdot V$$

Où $U = 1$ et $V = 0$ quand $t < TD$ et $U = 0$ et $V = 1$ quand $t > TD$ avec $TD = 4\tau_{A1}$. TD est un délai nécessaire pour que la phase de décroissance ne commence qu'après la phase de croissance. τ_{A1} et τ_{A2} sont les constantes de temps de croissance et décroissance de l'aptitude, respectivement

Selon le modèle A_{ptF} , la performance est définie par la somme de la fonction bi-exponentielle sérielle d'aptitude et d'une fonction impulsionnelle de fatigue, qui évoluent en parallèle :

$$\hat{p}_n = p_0 + \sum_{i=1}^{n-1} k_A w_{i-1} (1 - e^{-\frac{(n-i)}{\tau_{A1}}}) \cdot U + \sum_{i=1}^{n-1} k_A w_{i-1} e^{-\frac{(n-i)-TD}{\tau_{A2}}} \cdot V - \sum_{i=1}^{n-1} k_F w_{i-1} e^{-\frac{(n-i)}{\tau_F}}$$

Où $U = 1$ et $V = 0$ quand $t < TD$ et $U = 0$ et $V = 1$ quand $t > TD$ avec $TD = 4\tau_{A1}$. k_F et τ_F sont respectivement les constantes d'amplitude et de temps de la fatigue.

Estimation des paramètres des modèles

Les paramètres des modèles sont déterminés par ajustement de la performance modèle à la performance réelle pour l'ensemble des rats grâce à une analyse mixte. Dans ce type d'analyse, certains paramètres sont déterminés individuellement pour chaque rat, et d'autres sont communs à l'ensemble du groupe. Ici, les constantes de temps ont été déterminées pour l'ensemble du groupe par la méthode des algorithmes génétiques et les constantes

d'amplitudes individuelles ont été déterminées par régression linéaire, en minimisant la somme des carrés résiduels entre les performances réelle et modèle :

$$RSS = \sum_r^R \sum_{n=1}^N (p_n - \hat{p}_n)^2$$

Où RSS et la somme des carrés résiduels, n prend N valeurs correspondant aux jours où la performance réelle est mesurée et r prend R valeurs correspondant au nombre de rats. La qualité de l'ajustement est appréciée par le coefficient de détermination :

$$r^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS}$$

Où TSS et la somme totale des carrée.

La méthode employée ici est détaillée dans son ensemble dans le chapitre 1.3 de la partie Etat de la littérature du présent document.

Résultats et discussion préliminaires

La table 1 présente les résultats de l'ajustement des 3 modèles testés et classés selon un ordre de complexité progressivement croissant en terme de paramètre et donc de degré de liberté. Bien que les ajustements soient significatifs pour tous les modèles, l'analyse des gains de variance n'a révélé aucune amélioration de la qualité de l'ajustement des deux modèles les plus complexes de Banister et $A_{pt}F$ comparé au modèle le plus simple A_{pt} . Selon le principe de parcimonie, le modèle comportant le moins de degrés de liberté a été retenu, *i.e.* le modèle A_{pt} . L'absence de gain de variance significatif avec l'ajout de la fonction de transfert associée à la fatigue (modèle $A_{pt}F$) est probablement lié au fait que la constante de proportionnalité de fatigue, k_F , n'était significative que pour 6 rats parmi les 15 ayant suivi l'entraînement. Il semble que les charges d'entraînement imposées n'aient pas été suffisamment lourdes pour qu'un effet négatif de l'entraînement suffisamment marqué puisse être détecté comme significatif sur l'ensemble du groupe. Ces résultats sont en accord avec notre précédente étude où le modèle à fatigue variable comportant également 5 degrés de liberté [6] n'apportait également pas d'amélioration dans la description des variations de la performance à l'entraînement [4]. Dans la présente étude, bien que les modèles A_{pt} et de Banister décrivent les variations de performance avec une précision similaire, les paramètres de ces deux modèles sont très différents (table 2). Le modèle de Banister présente des constantes de temps

d'un ordre de grandeur équivalent, soit 48 jours et 49 jours pour l'aptitude et la fatigue respectivement signifiant que la performance est corrélée à la fois à l'aptitude et à la fatigue. Ce résultat représente une limite au modèle de Banister déjà évoquée, liée à la structure même des fonctions de transfert [2]. De plus, ces constantes de temps d'environ 50 jours ne semblent pas réalistes. Le modèle A_{pt} quant à lui, présente une constante de temps de croissance de l'aptitude (*i.e.* τ_{A_1}) de 0,61 jours et de décroissance de l'aptitude (*i.e.* τ_{A_2}) de 3,68 jours. Ces résultats signifient que 2,4 jours ($t = 4 * \tau_{A_1}$) après une charge d'entraînement, l'adaptation est maximale (98% de la réponse est atteinte) et diminue jusqu'à retrouver son état initial après 15 jours environ en l'absence de nouvelle stimulation ($t = 4 * \tau_{A_2}$). Cette cinétique d'évolution de l'aptitude au cours du temps semble proche des cinétiques du remodelage musculaire observées en réponse à l'entraînement en résistance et en situation de d'hypokinésie.

La vitesse de réponse des transcrits en réponse aux charges d'entraînement fait apparaître une réponse maximale 24h après entraînement [13]. Ce résultat est en accord avec une phase de croissance exponentielle pour les adaptations musculaires qui se développent pendant 2,4 jours comme le suggère les résultats du modèle physiologique de la présente étude. Par ailleurs, le fait que la voie canonique de synthèse des protéine passant par MTOR demeure activée jusqu'à 24h post exercice [16] est aussi en accord avec une phase de croissance exponentielle de 2,4 jours dans la présente étude. En ce qui concerne la constante de temps de disparition des effets de l'entraînement de 3,68, de façon intéressante, cette dernière peut être rapprochée de celle de 5 J qui décrit la perte de masse musculaire observée au cours 15 jours d'hypokinésie en situation de suspension du train arrière chez des rongeurs [17].

Conclusion

Bien que le modèle A_{pt} n'améliore pas la qualité absolue de l'ajustement du modèle comparé au modèle classique de Banister notre choix de le retenir dans cette étude est guidé par 2 raisons principales. Premièrement, il comporte moins de degrés de liberté que celui de Banister et selon le principe de parcimonie, à coefficient de détermination équivalent, il doit être retenu. Deuxièmement, l'évolution des adaptations musculaires prévue par le modèle en réponse à une charge d'entraînement reflète mieux la réalité de la plasticité musculaire que ce soit pour les cinétiques de synthèse protéique comme pour la disparition des effets comparé

au modèle de Banister dans lequel la réponse positive maximale est supposée intervenir immédiatement dans le décours de la charge d'entraînement. Avec la nouvelle structure sérielle du modèle proposée, les adaptations ne sont pas de nature impulsionnelle mais progressivement croissante selon une fonction exponentielle de type $1 - e^{-t/\tau_{A1}}$, atteint son apex à $t = 4 \tau_{A1}$ puis décroît selon une exponentielle dirigée par τ_{A2} . Les paramètres du modèle A_{pt} représentent l'amplitude des adaptations (k_a), la vitesse de leur mise en place ($1/\tau_{A1}$) et la vitesse de leur disparition ($1/\tau_{A2}$), *i.e.*, vitesse de retour à l'homéostasie. L'étape suivante dans l'élaboration d'un modèle physiologique détaillé consistera à mesurer directement et précisément la cinétique des principales adaptations qui surviennent en réponses aux charges d'entraînement en résistance à savoir (i) l'optimisation de la commande motrice, $A_{commande}$, (ii) les changements phénotypique, A_{MHC} , (iii) l'hypertrophie, $A_{hypertrophie}$ et (iv) les changements d'activité ATPasique par tête de myosine, A_{ATPase} . La structure mathématique du modèle prendra alors une forme telle que la performance sera la somme des 4 fonctions de transferts bi-exponentielles et sérielles évoquées précédemment :

$$\hat{p}_n = p_0 + A_{commande} + A_{MHC} + A_{hypertrophie} + A_{ATPase}$$

Les valeurs des constantes de temps seront déterminées sur la base de mesures biologiques et les constantes d'amplitude seront appréciées, quant à elles, en minimisant la somme des moindres carrés entre performances réelles et celles prévues par le modèle, \hat{p}_n . Si plusieurs fonctions de transfert présentent des constantes de temps similaires, alors ces dernières pourront être globalisées en un seul et même terme par soucis de parcimonie. Toujours dans cet objectif, si la constante d'amplitude d'un terme se rapproche de 0, *i.e.* son impact sur la performance est quasi inexistant comme on est en droit de le suspecter d'ailleurs pour les adaptations propres au phénotype, le terme sera supprimé.

Figure et tables

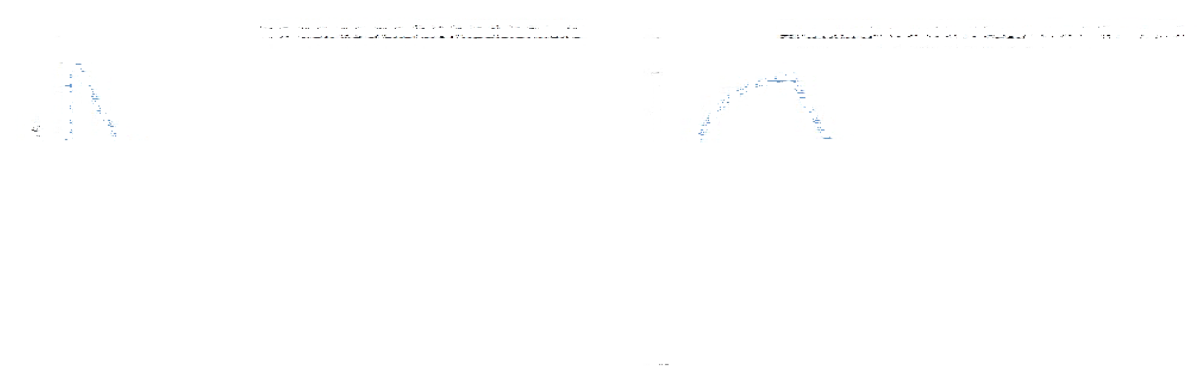


Figure 1 : Comparaison de la réponse à une charge de travail pour les deux modèles étudiés. A gauche, selon le modèle de Banister, la charge de travail provoque une augmentation instantanée de l'aptitude d'amplitude k , puis une décroissance au cours du temps caractérisé par τ . A droite, selon les modèles A_{pt} et $A_{pt}F$ proposés dans cette étude, l'aptitude d'amplitude k augmente de manière exponentielle à une vitesse déterminée par τ_{A_1} , puis décroît au cours du temps selon τ_{A_2} . Dans cette nouvelle structure de modèles proposée, la réponse n'est plus impulsionnelle mais bi exponentielle, les deux fonctions exponentielles étant montées en série.

Table 1

Modèle	R ²	Adj.R ²	F ratio	ddl	P
A ₂ *	0,71	0,65	12,24	3	< 0,001
Banister	0,79	0,73	13,16	4	< 0,001
A ₂ F ₁	0,76	0,67	8,23	5	< 0,01

* modèle retenu car les gains de variance pour les modèles plus complexes n'étaient pas significatifs

Table 2

Modèle	k _A	tau A ₁	tau A ₂	k _F	tau F
A ₂	0,0025 ± 0,0016	0,61	3,68	none	none
Banister	1,556 ± 3,099	none	48,34	1,79 ± 3,27	49,12
A ₂ F ₁	0,0037 ± 0,0025	0,33	5,72	0,0025 ± 0,0015	49,93

References

1. Banister EW, Hamilton CL. Variations in iron status with fatigue modelled from training in female distance runners. *Eur J Appl Physiol*. 1985;54(1):16–23.
2. Busso T, Häkkinen K, Pakarinen A, Carasso C, Lacour JR, Komi PV, et al. A systems model of training responses and its relationship to hormonal responses in elite weight-lifters. *Eur J Appl Physiol*. 1990;61(1-2):48–54.
3. Banister EW, Calvert TW, Savage MV, Bach T. A systems model of training for athletic performance. *Aust J Sports Med*. 1975;vol. 7:57–61.
4. Philippe AG, Py G, Favier FB, Sanchez AMJ, Bonniieu A, Busso T, et al. Modeling the responses to resistance training in an animal experiment study. *BioMed Res Int*. 2015;2015:914860.
5. Candau R, Busso T, Lacour JR. Effects of training on iron status in cross-country skiers. *Eur J Appl Physiol*. 1992;64(6):497–502.
6. Busso T. Variable dose-response relationship between exercise training and performance. *Med Sci Sports Exerc*. 2003 Jul;35(7):1188–95.
7. Sanchez AMJ, Galbès O, Fabre-Guery F, Thomas L, Douillard A, Py G, et al. Modelling training response in elite female gymnasts and optimal strategies of overload training and taper. *J Sports Sci*. 2013;31(14):1510–9.
8. Thomas L, Busso T. A theoretical study of taper characteristics to optimize performance. *Med Sci Sports Exerc*. 2005 Sep;37(9):1615–21.
9. Thomas L, Mujika I, Busso T. A model study of optimal training reduction during pre-event taper in elite swimmers. *J Sports Sci*. 2008 Apr;26(6):643–52.
10. Begue G, Douillard A, Galbes O, Rossano B, Vernus B, Candau R, et al. Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy. *PloS One*. 2013;8(2):e57141.
11. Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1993 Feb;74(2):911–5.
12. Trappe S, Costill D, Thomas R. Effect of swim taper on whole muscle and single muscle fiber contractile properties. *Med Sci Sports Exerc*. 2000 Dec;32(12):48–56.
13. Busso T, Flück M. A mixed-effects model of the dynamic response of muscle gene transcript expression to endurance exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2013 May;113(5):1279–90.
14. Lee S, Barton ER, Sweeney HL, Farrar RP. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2004 Mar;96(3):1097–104.
15. Izquierdo M, Ibañez J, Gorostiaga E, Garrues M, Zúñiga A, Antón A, et al. Maximal strength and power characteristics in isometric and dynamic actions of the upper and lower extremities in middle-aged and older men. *Acta Physiol Scand*. 1999 Sep;167(1):57–68.
16. Pagano AF, Py G, Bernardi H, Candau RB, Sanchez AMJ. Autophagy and protein turnover signaling in slow-twitch muscle during exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2014 Jul;46(7):1314–25.
17. Baldwin KM, Haddad F, Pandorf CE, Roy RR, Edgerton VR. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front Physiol*. 2013;4:284.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Abernethy PJ, Jürimäe J, Logan PA, Taylor AW, Thayer RE. 1994. Acute and chronic response of skeletal muscle to resistance exercise. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* **17**: 22–38.

Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA. 1993. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **74**: 911–915.

Aguiar AF, Aguiar DH, Felisberto ADS, Carani FR, Milanezi RC, Padovani CR, Dal-Pai-Silva M. 2010. Effects of creatine supplementation during resistance training on myosin heavy chain (MHC) expression in rat skeletal muscle fibers. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association* **24**: 88–96.

Alexiou H, Coutts AJ. 2008. A comparison of methods used for quantifying internal training load in women soccer players. *International Journal of Sports Physiology and Performance* **3**: 320–330.

Andersen JL, Klitgaard H, Saltin B. 1994. Myosin heavy chain isoforms in single fibres from m. vastus lateralis of sprinters: influence of training. *Acta Physiologica Scandinavica* **151**: 135–142.

D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, Rossi R, Carlizzi CN, Canepari M, Saltin B, Bottinelli R. 2003. The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology* **552**: 499–511.

D'Antona G, Lanfranconi F, Pellegrino MA, Brocca L, Adami R, Rossi R, Moro G, Miotto D, Canepari M, Bottinelli R. 2006. Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibres in male body builders. *The Journal of Physiology* **570**: 611–627.

Arata T, Mukohata Y, Tonomura Y. 1977. Structure and function of the two heads of the myosin molecule. VI. ATP hydrolysis, shortening, and tension development of myofibrils. *Journal of Biochemistry* **82**: 801–812.

Ausoni S, Gorza L, Schiaffino S, Gundersen K, Lomo T. 1990. Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **10**: 153–160.

Avalos M, Hellard P, Chatard JC. 2003. Modeling the training-performance relationship using a mixed model in elite swimmers. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **35**: 838–846.

Baar K, Esser K. 1999. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *The American Journal of Physiology* **276**: C120–127.

Bäck T. 1996. *Evolutionary Algorithms in Theory and Practice*. Oxford: Oxford University Press.

Bagshaw CR, Trentham DR. 1974. The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction. *The Biochemical Journal* **141**: 331–349.

- Bailey K, Perry SV. 1947.** The role of SH groups in the myosin-actin interaction. *The Biochemical Journal* **41**: xxii.
- Baldwin KM, Haddad F. 2001.** Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **90**: 345–357.
- Banister EW, Calvert TW, Savage MV, Bach T. 1975.** A systems model of training for athletic performance. *Australian Journal of Sports Medicine* **vol. 7**: 57–61.
- Banister EW, Carter JB, Zarkadas PC. 1999.** Training theory and taper: validation in triathlon athletes. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **79**: 182–191.
- Banister EW, Hamilton CL. 1985.** Variations in iron status with fatigue modelled from training in female distance runners. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **54**: 16–23.
- Bárány M. 1967.** ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *The Journal of General Physiology* **50**: Suppl:197–218.
- Barman TE, Travers F. 1985.** The rapid-flow-quench method in the study of fast reactions in biochemistry: extension to subzero conditions. *Methods of Biochemical Analysis* **31**: 1–59.
- Batters C, Veigel C, Homsher E, Sellers JR. 2014.** To understand muscle you must take it apart. *Frontiers in Physiology* **5**: 90.
- Beasley D, Bull D R, Martin R. 1993a.** An Overview of Genetic Algorithms : Part 1, Fundamentals.58–59.
- Beasley D, Bull D R, Martin R. 1993b.** An Overview of Genetic Algorithms : Part 2, Research Topics.170–181.
- Begue G, Douillard A, Galbes O, Rossano B, Vernus B, Candau R, Py G. 2013.** Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy. *PloS One* **8**: e57141.
- Bègue G. 2013.** Balance protéique et phénotype musculaire.
- Bellamy LM, Joannis S, Grubb A, Mitchell CJ, McKay BR, Phillips SM, Baker S, Parise G. 2014.** The acute satellite cell response and skeletal muscle hypertrophy following resistance training. *PloS One* **9**: e109739.
- Berthouze SE, Minaire PM, Castells J, Busso T, Vico L, Lacour JR. 1995.** Relationship between mean habitual daily energy expenditure and maximal oxygen uptake. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **27**: 1170–1179.
- Biolo G, Maggi SP, Williams BD, Tipton KD, Wolfe RR. 1995.** Increased rates of muscle protein turnover and amino acid transport after resistance exercise in humans. *The American Journal of Physiology* **268**: E514–520.

- Biolo G, Tipton KD, Klein S, Wolfe RR. 1997.** An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *The American Journal of Physiology* **273**: E122–129.
- Blaauw B, Reggiani C. 2014.** The role of satellite cells in muscle hypertrophy. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **35**: 3–10.
- Borg G. 1982.** Ratings of perceived exertion and heart rates during short-term cycle exercise and their use in a new cycling strength test. *International Journal of Sports Medicine* **3**: 153–158.
- Borg G, Hassmén P, Lagerström M. 1987.** Perceived exertion related to heart rate and blood lactate during arm and leg exercise. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **56**: 679–685.
- Borg G, Holmgren A, Lindblad I. 1981.** Quantitative evaluation of chest pain. *Acta Medica Scandinavica. Supplementum* **644**: 43–45.
- Borresen J, Lambert MI. 2009.** The quantification of training load, the training response and the effect on performance. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* **39**: 779–795.
- Bosquet L, Montpetit J, Arvisais D, Mujika I. 2007.** Effects of tapering on performance: a meta-analysis. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **39**: 1358–1365.
- Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C. 1994a.** Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology* **478 (Pt 2)**: 341–349.
- Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen GJ. 1994b.** Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *The Journal of Physiology* **481 (Pt 3)**: 663–675.
- Bottinelli R, Canepari M, Pellegrino MA, Reggiani C. 1996.** Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. *The Journal of Physiology* **495 (Pt 2)**: 573–586.
- Bottinelli R, Pellegrino MA, Canepari M, Rossi R, Reggiani C. 1999.** Specific contributions of various muscle fibre types to human muscle performance: an in vitro study. *Journal of Electromyography and Kinesiology: Official Journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology* **9**: 87–95.
- Bowater R, Sleep J. 1988.** Demembranated muscle fibers catalyze a more rapid exchange between phosphate and adenosine triphosphate than actomyosin subfragment 1. *Biochemistry* **27**: 5314–5323.
- Brenner B, Schoenberg M, Chalovich JM, Greene LE, Eisenberg E. 1982.** Evidence for cross-bridge attachment in relaxed muscle at low ionic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 7288–7291.
- Brooks SV. 2003.** Current topics for teaching skeletal muscle physiology. *Advances in Physiology Education* **27**: 171–182.

Brune M, Hunter JL, Corrie JE, Webb MR. 1994. Direct, real-time measurement of rapid inorganic phosphate release using a novel fluorescent probe and its application to actomyosin subfragment 1 ATPase. *Biochemistry* **33**: 8262–8271.

Brunello E, Bianco P, Piazzesi G, Linari M, Reconditi M, Panine P, Narayanan T, Helsby WI, Irving M, Lombardi V. 2006. Structural changes in the myosin filament and cross-bridges during active force development in single intact frog muscle fibres: stiffness and X-ray diffraction measurements. *The Journal of Physiology* **577**: 971–984.

Brunello E, Reconditi M, Elangovan R, Linari M, Sun YB, Narayanan T, Panine P, Piazzesi G, Irving M, Lombardi V. 2007. Skeletal muscle resists stretch by rapid binding of the second motor domain of myosin to actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 20114–20119.

Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. 1960. Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *The Journal of Physiology* **150**: 417–439.

Busso T, Häkkinen K, Pakarinen A, Carasso C, Lacour JR, Komi PV, Kauhanen H. 1990. A systems model of training responses and its relationship to hormonal responses in elite weight-lifters. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **61**: 48–54.

Busso T, Häkkinen K, Pakarinen A, Kauhanen H, Komi PV, Lacour JR. 1992. Hormonal adaptations and modelled responses in elite weightlifters during 6 weeks of training. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **64**: 381–386.

Busso T, Denis C, Bonnefoy R, Geyssant A, Lacour JR. 1997. Modeling of adaptations to physical training by using a recursive least squares algorithm. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **82**: 1685–1693.

Busso T, Benoit H, Bonnefoy R, Feasson L, Lacour JR. 2002. Effects of training frequency on the dynamics of performance response to a single training bout. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **92**: 572–580.

Busso T. 2003. Variable dose-response relationship between exercise training and performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **35**: 1188–1195.

Busso T, Candau R, Lacour JR. 1994. Fatigue and fitness modelled from the effects of training on performance. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **69**: 50–54.

Busso, Carasso C, Lacour JR. 1991. Adequacy of a systems structure in the modeling of training effects on performance. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **71**: 2044–2049.

Busso T, Flück M. 2013. A mixed-effects model of the dynamic response of muscle gene transcript expression to endurance exercise. *European Journal of Applied Physiology* **113**: 1279–1290.

Calvert TW, Banister EW, Savage MV, Bach T. 1976. A systems models of the effects of training on physical performance. *IEEE Transactions Systems, Man and Cybernetics* **6**.

Campbell EL, Seynnes OR, Bottinelli R, McPhee JS, Atherton PJ, Jones DA, Butler-Browne G, Narici MV. 2013. Skeletal muscle adaptations to physical inactivity and subsequent retraining in young men. *Biogerontology* **14**: 247–259.

Candau R, Iorga B, Travers F, Barman T, Lionne C. 2003. At physiological temperatures the ATPase rates of shortening soleus and psoas myofibrils are similar. *Biophysical Journal* **85**: 3132–3141.

Candau R, Busso T, Lacour JR. 1992. Effects of training on iron status in cross-country skiers. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **64**: 497–502.

Candau R, Kawai M. 2010. Muscle contraction and supplying ATP to muscle cells. Exercise Physiology: From a Cellular to an Integrative Approach. Amsterdam: P. Connes et al., 2–26.

Canepari M, Rossi R, Pellegrino MA, Orrell RW, Cobbold M, Harridge S, Bottinelli R. 2005. Effects of resistance training on myosin function studied by the in vitro motility assay in young and older men. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **98**: 2390–2395.

Canepari M, Pellegrino MA, D'Antona G, Bottinelli R. 2010. Skeletal muscle fibre diversity and the underlying mechanisms. *Acta Physiologica (Oxford, England)* **199**: 465–476.

Caremani M, Dantzig J, Goldman YE, Lombardi V, Linari M. 2008. Effect of inorganic phosphate on the force and number of myosin cross-bridges during the isometric contraction of permeabilized muscle fibers from rabbit psoas. *Biophysical Journal* **95**: 5798–5808.

Caremani M, Melli L, Dolfi M, Lombardi V, Linari M. 2013. The working stroke of the myosin II motor in muscle is not tightly coupled to release of orthophosphate from its active site. *The Journal of Physiology* **591**: 5187–5205.

Caremani M, Melli L, Dolfi M, Lombardi V, Linari M. 2015. Force and number of myosin motors during muscle shortening and the coupling with the release of the ATP hydrolysis products. *The Journal of Physiology* **593**: 3313–3332.

Carroll TJ, Abernethy PJ, Logan PA, Barber M, McEniery MT. 1998. Resistance training frequency: strength and myosin heavy chain responses to two and three bouts per week. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **78**: 270–275.

Chalencon S, Busso T, Lacour JR, Garet M, Pichot V, Connes P, Gabel CP, Roche F, Barthélémy JC. 2012. A model for the training effects in swimming demonstrates a strong relationship between parasympathetic activity, performance and index of fatigue. *PloS One* **7**: e52636.

Cooke R. 2007. Modulation of the actomyosin interaction during fatigue of skeletal muscle. *Muscle & Nerve* **36**: 756–777.

Crozier SJ, Kimball SR, Emmert SW, Anthony JC, Jefferson LS. 2005. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. *The Journal of Nutrition* **135**: 376–382.

Davidian M, Giltinan DM. 1995. *Nonlinear Models For Repeated Measurement Data*. London.

Day ML, McGuigan MR, Brice G, Foster C. 2004. Monitoring exercise intensity during resistance training using the session RPE scale. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association* **18**: 353–358.

Deyhle MR, Hsu HS, Fairfield TJ, Cadez-Schmidt TL, Gurney BA, Mermier CM. 2015. Relative Importance of Four Muscle Groups for Indoor Rock Climbing Performance. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association* **29**: 2006–2014.

Doucet P, Sloep PB. 1992. *Mathematical Modeling in the Life Sciences*. New York: E. Horwood.

Duchateau J, Hainaut K. 1988. Training effects of sub-maximal electrostimulation in a human muscle. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **20**: 99–104.

Duggal D, Nagwekar J, Rich R, Midde K, Fudala R, Gryczynski I, Borejdo J. 2014. Phosphorylation of myosin regulatory light chain has minimal effect on kinetics and distribution of orientations of cross bridges of rabbit skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **306**: R222–233.

Duncan ND, Williams DA, Lynch GS. 1998. Adaptations in rat skeletal muscle following long-term resistance exercise training. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **77**: 372–378.

Ebashi S. 1963. THIRD COMPONENT PARTICIPATING IN THE SUPERPRECIPITATION OF ‘NATURAL ACTOMYOSIN’. *Nature* **200**: 1010.

Ebashi S, Ebashi F. 1964. A NEW PROTEIN COMPONENT PARTICIPATING IN THE SUPERPRECIPITATION OF MYOSIN B. *Journal of Biochemistry* **55**: 604–613.

Ebashi S, Kodama A. 1965. A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *Journal of Biochemistry* **58**: 107–108.

Ecken J von der, Müller M, Lehman W, Manstein DJ, Penczek PA, Raunser S. 2015. Structure of the F-actin-tropomyosin complex. *Nature* **519**: 114–117.

Edman KA. 1979. The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibres. *The Journal of Physiology* **291**: 143–159.

Elangovan R, Capitanio M, Melli L, Pavone FS, Lombardi V, Piazzesi G. 2012. An integrated in vitro and in situ study of kinetics of myosin II from frog skeletal muscle. *The Journal of Physiology* **590**: 1227–1242.

Ellefsen S, Vikmoen O, Zacharoff E, Rauk I, Slettaløkken G, Hammarström D, Strand TA, Whist JE, Hanestadhaugen M, Vegge G, et al. 2014. Reliable determination of training-induced alterations in muscle fiber composition in human skeletal muscle using quantitative polymerase chain reaction. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **24**: e332–342.

Engel WK. 1998. The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. 1962. *Neurology* **51**: 655 and 17 pages following.

Erschine RM, Jones DA, Williams AG, Stewart CE, Degens H. 2010. Resistance training increases in vivo quadriceps femoris muscle specific tension in young men. *Acta Physiologica (Oxford, England)* **199**: 83–89.

Farthing JP, Krentz JR, Magnus CRA. 2009. Strength training the free limb attenuates strength loss during unilateral immobilization. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **106**: 830–836.

Farup J, de Paoli F, Bjerg K, Riis S, Ringgard S, Vissing K. 2015. Blood flow restricted and traditional resistance training performed to fatigue produce equal muscle hypertrophy. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*.

Fenn WO. 1923. A quantitative comparison between the energy liberated and the work performed by the isolated sartorius muscle of the frog. *The Journal of Physiology* **58**: 175–203.

Fenn WO. 1924. The relation between the work performed and the energy liberated in muscular contraction. *The Journal of Physiology* **58**: 373–395.

Filatov VL, Katrukha AG, Bulargina TV, Gusev NB. 1999. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry. Biokhimiia* **64**: 969–985.

Finer JT, Mehta AD, Spudich JA. 1995. Characterization of single actin-myosin interactions. *Biophysical Journal* **68**: 291S–296S; discussion 296S–297S.

Fink RH, Stephenson DG, Williams DA. 1990. Physiological properties of skinned fibres from normal and dystrophic (Duchenne) human muscle activated by Ca²⁺ and Sr²⁺. *The Journal of Physiology* **420**: 337–353.

Fitz-Clarke JR, Morton RH, Banister EW. 1991. Optimizing athletic performance by influence curves. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **71**: 1151–1158.

Foster C, Daines E, Hector L, Snyder AC, Welsh R. 1996. Athletic performance in relation to training load. *Wisconsin Medical Journal* **95**: 370–374.

Foster C, Florhaug JA, Franklin J, Gottschall L, Hrovatin LA, Parker S, Doleshal P, Dodge C. 2001. A new approach to monitoring exercise training. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association* **15**: 109–115.

Franchini E, Sterkowicz S, Meira CMJ, Gomes FRF, Tani G. 2008. Technical variation in a sample of high level judo players. *Perceptual and Motor Skills* **106**: 859–869.

Franchini E, Del Vecchio FB, Matsushigue KA, Artioli GG. 2011. Physiological profiles of elite judo athletes. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* **41**: 147–166.

Frank G, Weeds AG. 1974. The amino-acid sequence of the alkali light chains of rabbit skeletal-muscle myosin. *European journal of biochemistry / FEBS* **44**: 317–334.

- Fry CS, Glynn EL, Drummond MJ, Timmerman KL, Fujita S, Abe T, Dhanani S, Volpi E, Rasmussen BB. 2010.** Blood flow restriction exercise stimulates mTORC1 signaling and muscle protein synthesis in older men. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **108**: 1199–1209.
- Fusi L, Brunello E, Sevriva IR, Sun YB, Irving M. 2014.** Structural dynamics of troponin during activation of skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 4626–4631.
- Fusi L, Huang Z, Irving M. 2015.** The Conformation of Myosin Heads in Relaxed Skeletal Muscle: Implications for Myosin-Based Regulation. *Biophysical Journal* **109**: 783–792.
- Geeves MA, Holmes KC. 1999.** Structural mechanism of muscle contraction. *Annual Review of Biochemistry* **68**: 687–728.
- Geeves MA, Holmes KC. 2005.** The molecular mechanism of muscle contraction. *Advances in Protein Chemistry* **71**: 161–193.
- Goldberg AL. 1968.** Protein synthesis during work-induced growth of skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology* **36**: 653–658.
- Goldspink G. 1999.** Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *Journal of Anatomy* **194 (Pt 3)**: 323–334.
- Goodno CC, Wall CM, Perry SV. 1978.** Kinetics and regulation of the myofibrillar adenosine triphosphatase. *The Biochemical Journal* **175**: 813–821.
- Gordon AM, Homsher E, Regnier M. 2000.** Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological Reviews* **80**: 853–924.
- Grasser H., Hill AV. 1924.** The dynamics of muscle contraction. *Proc. Roy Soc*: 398–437.
- Greaser ML, Moss RL, Reiser PJ. 1988.** Variations in contractile properties of rabbit single muscle fibres in relation to troponin T isoforms and myosin light chains. *The Journal of Physiology* **406**: 85–98.
- Green HJ, Hughson RL, Orr GW, Ranney DA. 1983.** Anaerobic threshold, blood lactate, and muscle metabolites in progressive exercise. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology* **54**: 1032–1038.
- Greenberg MJ, Mealy TR, Jones M, Szczesna-Cordary D, Moore JR. 2010.** The direct molecular effects of fatigue and myosin regulatory light chain phosphorylation on the actomyosin contractile apparatus. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **298**: R989–996.
- Guhathakurta P, Prochniewicz E, Thomas DD. 2015.** Amplitude of the actomyosin power stroke depends strongly on the isoform of the myosin essential light chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 4660–4665.

Haddad F, Qin AX, Zeng M, McCue SA, Baldwin KM. 1998. Effects of isometric training on skeletal myosin heavy chain expression. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **84**: 2036–2041.

Haddad F, Adams GR, Bodell PW, Baldwin KM. 2006. Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **100**: 433–441.

Haddad M, Chaouachi A, Castagna C, Wong DP, Behm DG, Chamari K. 2011. The construct validity of session RPE during an intensive camp in young male Taekwondo athletes. *International Journal of Sports Physiology and Performance* **6**: 252–263.

Hagin V, Gonzales BR, Candau RB, Gros Lambert A. 2012. Influence of a conservative sleep management strategy during a solo Pacific Ocean crossing on anxiety and perceived fatigue: a case study. *Journal of Sports Sciences* **30**: 395–402.

Häkkinen K, Pakarinen A, Alén M, Kauhanen H, Komi PV. 1988. Daily hormonal and neuromuscular responses to intensive strength training in 1 week. *International Journal of Sports Medicine* **9**: 422–428.

Hanson J, Huxley HE. 1953. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature* **172**: 530–532.

Harada Y, Sakurada K, Aoki T, Thomas DD, Yanagida T. 1990. Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay. *Journal of Molecular Biology* **216**: 49–68.

Harber MP, Gallagher PM, Creer AR, Minchev KM, Trappe SW. 2004. Single muscle fiber contractile properties during a competitive season in male runners. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **287**: R1124–1131.

Hariadi RF, Cale M, Sivaramakrishnan S. 2014. Myosin lever arm directs collective motion on cellular actin network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 4091–4096.

Harrington WF, Karr T, Busa WB, Lovell SJ. 1990. Contraction of myofibrils in the presence of antibodies to myosin subfragment 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7453–7456.

He ZH, Bottinelli R, Pellegrino MA, Ferenczi MA, Reggiani C. 2000. ATP consumption and efficiency of human single muscle fibers with different myosin isoform composition. *Biophysical Journal* **79**: 945–961.

Hellard P, Avalos M, Millet G, Lacoste L, Barale F, Chatard JC. 2005. Modeling the residual effects and threshold saturation of training: a case study of Olympic swimmers. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association* **19**: 67–75.

Hellard P, Avalos M, Lacoste L, Barale F, Chatard JC, Millet GP. 2006. Assessing the limitations of the Banister model in monitoring training. *Journal of Sports Sciences* **24**: 509–520.

- Herrmann C, Sleep J, Chaussepied P, Travers F, Barman T. 1993.** A structural and kinetic study on myofibrils prevented from shortening by chemical cross-linking. *Biochemistry* **32**: 7255–7263.
- Herrmann C, Lionne C, Travers F, Barman T. 1994.** Correlation of ActoS1, myofibrillar, and muscle fiber ATPases. *Biochemistry* **33**: 4148–4154.
- Herzog W, Powers K, Johnston K, Duvall M. 2015.** A new paradigm for muscle contraction. *Frontiers in Physiology* **6**: 174.
- Higuchi S, Tsukasaki Y, Fukuda N, Kurihara S, Fujita H. 2011.** Thin filament-reconstituted skinned muscle fibers for the study of muscle physiology. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* **2011**: 486021.
- Higuchi H, Yanagida T, Goldman YE. 1995.** Compliance of thin filaments in skinned fibers of rabbit skeletal muscle. *Biophysical Journal* **69**: 1000–1010.
- Hill AV. 1938.** The Heat of Shortening and the Dynamic Constants of Muscle. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **126**: 136–195.
- Hoh JF. 1975.** Selective and non-selective reinnervation of fast-twitch and slow-twitch rat skeletal muscle. *The Journal of Physiology* **251**: 791–801.
- Holm L, Reitelseder S, Pedersen TG, Doessing S, Petersen SG, Flyvbjerg A, Andersen JL, Aagaard P, Kjaer M. 2008.** Changes in muscle size and MHC composition in response to resistance exercise with heavy and light loading intensity. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **105**: 1454–1461.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. 1990.** Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**: 44–49.
- Holmes KC, Angert I, Kull FJ, Jahn W, Schröder RR. 2003.** Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* **425**: 423–427.
- Hopkins WG, Hawley JA, Burke LM. 1999.** Design and analysis of research on sport performance enhancement. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **31**: 472–485.
- Hornberger TA, Farrar RP. 2004.** Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne De Physiologie Appliquée* **29**: 16–31.
- Horowitz R, Kempner ES, Bisher ME, Podolsky RJ. 1986.** A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature* **323**: 160–164.
- Houadjeto M, Barman T, Travers F. 1991.** What is the true ATPase activity of contracting myofibrils? *FEBS letters* **281**: 105–107.
- Houdusse A, Sweeney HL. 2001.** Myosin motors: missing structures and hidden springs. *Current Opinion in Structural Biology* **11**: 182–194.
- Howard J. 2001.** Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton. Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton. Sinauer Associates, Inc, 384.

Huxley AF. 1957. Muscle structure and theories of contraction. *Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry* **7**: 255–318.

Huxley HE. 1963. ELECTRON MICROSCOPE STUDIES ON THE STRUCTURE OF NATURAL AND SYNTHETIC PROTEIN FILAMENTS FROM STRIATED MUSCLE. *Journal of Molecular Biology* **7**: 281–308.

Huxley AF, Simmons RM. 1971. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* **233**: 533–538.

Ikai M, Fukunaga T. 1968. Calculation of muscle strength per unit cross-sectional area of human muscle by means of ultrasonic measurement. *Internationale Zeitschrift Für Angewandte Physiologie, Einschliesslich Arbeitsphysiologie* **26**: 26–32.

Impellizzeri FM, Rampinini E, Coutts AJ, Sassi A, Marcora SM. 2004. Use of RPE-based training load in soccer. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **36**: 1042–1047.

Ishijima A, Doi T, Sakurada K, Yanagida T. 1991. Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin in vitro. *Nature* **352**: 301–306.

Jackson JR, Mula J, Kirby TJ, Fry CS, Lee JD, Ubele MF, Campbell KS, McCarthy JJ, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE. 2012. Satellite cell depletion does not inhibit adult skeletal muscle regrowth following unloading-induced atrophy. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **303**: C854–861.

Jaweed MM, Herbison GJ, Ditunno JF. 1977. Myosin ATPase activity after strengthening exercise. *Journal of Anatomy* **124**: 371–381.

Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC. 1990. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**: 37–44.

Kabsch W, Vandekerckhove J. 1992. Structure and function of actin. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **21**: 49–76.

Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, *et al.* 2004. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 41114–41123.

Kampourakis T, Irving M. 2015. Phosphorylation of myosin regulatory light chain controls myosin head conformation in cardiac muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **85**: 199–206.

Kawada S, Ishii N. 2005. Skeletal muscle hypertrophy after chronic restriction of venous blood flow in rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **37**: 1144–1150.

Kawada S, Ishii N. 2008. Changes in skeletal muscle size, fibre-type composition and capillary supply after chronic venous occlusion in rats. *Acta Physiologica (Oxford, England)* **192**: 541–549.

Kenttä G, Hassmén P. 1998. Overtraining and recovery. A conceptual model. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* **26**: 1–16.

Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature Cell Biology* **10**: 935–945.

Kirby TJ, McCarthy JJ. 2013. MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation. *Free Radical Biology & Medicine* **64**: 95–105.

Klitgaard H. 1988. A model for quantitative strength training of hindlimb muscles of the rat. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **64**: 1740–1745.

Kondalenko VF, Sergeev IP, Ivanitskaia VV. 1981. [Electron microscopic study of signs of skeletal muscle fiber hyperplasia in athletes]. *Arkiv Anatomii, Gistologii I Émbriologii* **80**: 66–70.

Koubassova NA, Tsaturyan AK. 2011. Molecular mechanism of actin-myosin motor in muscle. *Biochemistry. Biokhimiia* **76**: 1484–1506.

Kron SJ, Spudich JA. 1986. Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 6272–6276.

Kubukeli ZN, Noakes TD, Dennis SC. 2002. Training techniques to improve endurance exercise performances. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* **32**: 489–509.

Kuipers H. 1998. Training and overtraining: an introduction. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **30**: 1137–1139.

Kushmerick MJ, Larson RE, Davies RE. 1969. The chemical energetics of muscle contraction. I. Activation heat, heat of shortening and ATP utilization for activation-relaxation processes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **174**: 293–313.

Labeit S, Kolmerer B. 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science (New York, N.Y.)* **270**: 293–296.

Larsson L, Li X, Frontera WR. 1997. Effects of aging on shortening velocity and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells. *The American Journal of Physiology* **272**: C638–649.

Larsson L, Moss RL. 1993. Maximum velocity of shortening in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscles. *The Journal of Physiology* **472**: 595–614.

Lee S, Barton ER, Sweeney HL, Farrar RP. 2004. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **96**: 1097–1104.

Leonard TR, Herzog W. 2010. Regulation of muscle force in the absence of actin-myosin-based cross-bridge interaction. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **299**: C14–20.

- Levine RJ, Kensler RW, Yang Z, Stull JT, Sweeney HL. 1996.** Myosin light chain phosphorylation affects the structure of rabbit skeletal muscle thick filaments. *Biophysical Journal* **71**: 898–907.
- Levine RJ, Yang Z, Epstein ND, Fananapazir L, Stull JT, Sweeney HL. 1998.** Structural and functional responses of mammalian thick filaments to alterations in myosin regulatory light chains. *Journal of Structural Biology* **122**: 149–161.
- Levitsky DI, Rostkova EV, Orlov VN, Nikolaeva OP, Moiseeva LN, Teplova MV, Gusev NB. 2000.** Complexes of smooth muscle tropomyosin with F-actin studied by differential scanning calorimetry. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**: 1869–1877.
- Linari M, Caremani M, Piperio C, Brandt P, Lombardi V. 2007.** Stiffness and fraction of Myosin motors responsible for active force in permeabilized muscle fibers from rabbit psoas. *Biophysical Journal* **92**: 2476–2490.
- Linari M, Caremani M, Lombardi V. 2010.** A kinetic model that explains the effect of inorganic phosphate on the mechanics and energetics of isometric contraction of fast skeletal muscle. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* **277**: 19–27.
- Lionne C, Brune M, Webb MR, Travers F, Barman T. 1995.** Time resolved measurements show that phosphate release is the rate limiting step on myofibrillar ATPases. *FEBS letters* **364**: 59–62.
- Lionne C, Iorga B, Candau R, Piroddi N, Webb MR, Belus A, Travers F, Barman T. 2002.** Evidence that phosphate release is the rate-limiting step on the overall ATPase of psoas myofibrils prevented from shortening by chemical cross-linking. *Biochemistry* **41**: 13297–13308.
- Lionne C, Iorga B, Candau R, Travers F. 2003.** Why choose myofibrils to study muscle myosin ATPase? *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **24**: 139–148.
- Lionne C, Travers F, Barman T. 1996.** Mechanochemical coupling in muscle: attempts to measure simultaneously shortening and ATPase rates in myofibrils. *Biophysical Journal* **70**: 887–895.
- Liu Y, Schlumberger A, Wirth K, Schmidtbleicher D, Steinacker JM. 2003.** Different effects on human skeletal myosin heavy chain isoform expression: strength vs. combination training. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **94**: 2282–2288.
- Llinas P, Pylypenko O, Isabet T, Mukherjea M, Sweeney HL, Houdusse AM. 2012.** How myosin motors power cellular functions: an exciting journey from structure to function: based on a lecture delivered at the 34th FEBS Congress in Prague, Czech Republic, July 2009. *The FEBS journal* **279**: 551–562.
- Llinas P, Isabet T, Song L, Ropars V, Zong B, Benisty H, Sirigu S, Morris C, Kikuti C, Safer D, *et al.* 2015.** How actin initiates the motor activity of Myosin. *Developmental Cell* **33**: 401–412.
- Lombardi V, Piazzesi G, Reconditi M, Linari M, Lucii L, Stewart A, Sun YB, Boesecke P, Narayanan T, Irving T, *et al.* 2004.** X-ray diffraction studies of the contractile

mechanism in single muscle fibres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **359**: 1883–1893.

Lorenz M, Poole KJ, Popp D, Rosenbaum G, Holmes KC. 1995. An atomic model of the unregulated thin filament obtained by X-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels. *Journal of Molecular Biology* **246**: 108–119.

Lorenz M, Holmes KC. 2010. The actin-myosin interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 12529–12534.

Lowey S, Risby D. 1971. Light chains from fast and slow muscle myosins. *Nature* **234**: 81–85.

Lowey S, Waller GS, Trybus KM. 1993. Function of skeletal muscle myosin heavy and light chain isoforms by an in vitro motility assay. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 20414–20418.

Lymn RW, Taylor EW. 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**: 4617–4624.

MacKenzie MG, Hamilton DL, Murray JT, Taylor PM, Baar K. 2009. mVps34 is activated following high-resistance contractions. *The Journal of Physiology* **587**: 253–260.

MacLeod D, Sutherland DL, Buntin L, Whitaker A, Aitchison T, Watt I, Bradley J, Grant S. 2007. Physiological determinants of climbing-specific finger endurance and sport rock climbing performance. *Journal of Sports Sciences* **25**: 1433–1443.

Maffei M, Longa E, Qaisar R, Agoni V, Desaphy JF, Camerino DC, Bottinelli R, Canepari M. 2014. Actin sliding velocity on pure myosin isoforms from hindlimb unloaded mice. *Acta Physiologica (Oxford, England)* **212**: 316–329.

Magnin V. 1998. Contribution à l'étude et à l'optimisation de composants optoélectroniques.

Malisoux L, Francaux M, Nielens H, Renard P, Lebacqz J, Theisen D. 2006. Calcium sensitivity of human single muscle fibers following plyometric training. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **38**: 1901–1908.

Málnási-Csizmadia A, Tóth J, Pearson DS, Hetényi C, Nyitrai L, Geeves MA, Bagshaw CR, Kovács M. 2007. Selective perturbation of the myosin recovery stroke by point mutations at the base of the lever arm affects ATP hydrolysis and phosphate release. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 17658–17664.

Marti B, Abelin T, Minder CE. 1988. Relationship of training and life-style to 16-km running time of 4000 joggers. The '84 Berne 'Grand-Prix' Study. *International Journal of Sports Medicine* **9**: 85–91.

McCall GE, Byrnes WC, Dickinson A, Pattany PM, Fleck SJ. 1996. Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **81**: 2004–2012.

McCarthy JJ, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, Srikuea R, Lawson BA, Grimes B, Keller C, et al. 2011. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development (Cambridge, England)* **138**: 3657–3666.

McCullagh KJA, Calabria E, Pallafacchina G, Ciciliot S, Serrano AL, Argentini C, Kalhovde JM, Lomo T, Schiaffino S. 2004. NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 10590–10595.

McDonagh MJ, Davies CT. 1984. Adaptive response of mammalian skeletal muscle to exercise with high loads. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* **52**: 139–155.

Metzger JM, Greaser ML, Moss RL. 1989. Variations in cross-bridge attachment rate and tension with phosphorylation of myosin in mammalian skinned skeletal muscle fibers. Implications for twitch potentiation in intact muscle. *The Journal of General Physiology* **93**: 855–883.

Michalewicz Z. 1994. *Genetic Algorithms + Data Structures = Evolution Programs*. Berlin: Springer-Verlag.

Millet GP, Candau RB, Barbier B, Busso T, Rouillon JD, Chatard JC. 2002. Modelling the transfers of training effects on performance in elite triathletes. *International Journal of Sports Medicine* **23**: 55–63.

Minetto MA, Qaisar R, Agoni V, Motta G, Longa E, Miotti D, Pellegrino MA, Bottinelli R. 2015. Quantitative and qualitative adaptations of muscle fibers to glucocorticoids. *Muscle & Nerve*.

Morimoto K, Harrington WF. 1974. Substructure of the thick filament of vertebrate striated muscle. *Journal of Molecular Biology* **83**: 83–97.

Morton RH, Fitz-Clarke JR, Banister EW. 1990. Modeling human performance in running. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **69**: 1171–1177.

Moss RL, Diffie GM, Greaser ML. 1995. Contractile properties of skeletal muscle fibers in relation to myofibrillar protein isoforms. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **126**: 1–63.

Motulsky HJ, Ransnas LA. 1987. Fitting curves to data using nonlinear regression: a practical and nonmathematical review. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **1**: 365–374.

Mujika I, Busso T, Lacoste L, Barale F, Geysant A, Chatard JC. 1996. Modeled responses to training and taper in competitive swimmers. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **28**: 251–258.

Mujika I, Padilla S. 2003. Scientific bases for precompetition tapering strategies. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **35**: 1182–1187.

Murakami K, Yasunaga T, Noguchi TQP, Gomibuchi Y, Ngo KX, Uyeda TQP, Wakabayashi T. 2010. Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release. *Cell* **143**: 275–287.

Muretta JM, Petersen KJ, Thomas DD. 2013. Direct real-time detection of the actin-activated power stroke within the myosin catalytic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 7211–7216.

Neary JP, Bhambhani YN, McKenzie DC. 2003. Effects of different stepwise reduction taper protocols on cycling performance. *Canadian Journal of Applied Physiology = Revue Canadienne De Physiologie Appliquée* **28**: 576–587.

Nie QM, Togashi A, Sasaki TN, Takano M, Sasai M, Terada TP. 2014. Coupling of lever arm swing and biased Brownian motion in actomyosin. *PLoS computational biology* **10**: e1003552.

Nielsen JL, Aagaard P, Bech RD, Nygaard T, Hvid LG, Wernbom M, Suetta C, Frandsen U. 2012. Proliferation of myogenic stem cells in human skeletal muscle in response to low-load resistance training with blood flow restriction. *The Journal of Physiology* **590**: 4351–4361.

Nyitrai M, Rossi R, Adamek N, Pellegrino MA, Bottinelli R, Geeves MA. 2006. What limits the velocity of fast-skeletal muscle contraction in mammals? *Journal of Molecular Biology* **355**: 432–442.

Oda T, Iwasa M, Aihara T, Maéda Y, Narita A. 2009. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* **457**: 441–445.

Odronitz F, Kollmar M. 2007. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biology* **8**: R196.

Otterbein LR, Graceffa P, Dominguez R. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science (New York, N.Y.)* **293**: 708–711.

Pagano AF, Py G, Bernardi H, Candau RB, Sanchez AMJ. 2014. Autophagy and protein turnover signaling in slow-twitch muscle during exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **46**: 1314–1325.

Pansarasa O, Rinaldi C, Parente V, Miotti D, Capodaglio P, Bottinelli R. 2009. Resistance training of long duration modulates force and unloaded shortening velocity of single muscle fibres of young women. *Journal of Electromyography and Kinesiology: Official Journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology* **19**: e290–300.

Parente V, D'Antona G, Adami R, Miotti D, Capodaglio P, De Vito G, Bottinelli R. 2008. Long-term resistance training improves force and unloaded shortening velocity of single muscle fibres of elderly women. *European Journal of Applied Physiology* **104**: 885–893.

Pate E, Franks-Skiba K, Cooke R. 1998. Depletion of phosphate in active muscle fibers probes actomyosin states within the powerstroke. *Biophysical Journal* **74**: 369–380.

Perry SV. 2003. When was actin first extracted from muscle? *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **24**: 597–599.

Petrella JK, Kim JS, Cross JM, Kosek DJ, Bamman MM. 2006. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **291**: E937–946.

Petrella JK, Kim JS, Mayhew DL, Cross JM, Bamman MM. 2008. Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: a cluster analysis. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **104**: 1736–1742.

Pette D, Vrbová G. 1999. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle & Nerve* **22**: 666–677.

Philippe M, Wegst D, Müller T, Raschner C, Burtscher M. 2012. Climbing-specific finger flexor performance and forearm muscle oxygenation in elite male and female sport climbers. *European Journal of Applied Physiology* **112**: 2839–2847.

Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. 1997. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *The American Journal of Physiology* **273**: E99–107.

Phillips SM. 2014. A brief review of critical processes in exercise-induced muscular hypertrophy. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* **44 Suppl 1**: S71–77.

Philp A, Hamilton DL, Baar K. 2011. Signals mediating skeletal muscle remodeling by resistance exercise: PI3-kinase independent activation of mTORC1. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **110**: 561–568.

Potma EJ, van Graas IA, Stienen GJ. 1995. Influence of inorganic phosphate and pH on ATP utilization in fast and slow skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal* **69**: 2580–2589.

Potma EJ, Stienen GJ. 1996. Increase in ATP consumption during shortening in skinned fibres from rabbit psoas muscle: effects of inorganic phosphate. *The Journal of Physiology* **496 (Pt 1)**: 1–12.

Potter JD. 1974. The content of troponin, tropomyosin, actin, and myosin in rabbit skeletal muscle myofibrils. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **162**: 436–441.

Powers K, Schappacher-Tilp G, Jinha A, Leonard T, Nishikawa K, Herzog W. 2014. Titin force is enhanced in actively stretched skeletal muscle. *The Journal of Experimental Biology* **217**: 3629–3636.

Preller M, Holmes KC. 2013. The myosin start-of-power stroke state and how actin binding drives the power stroke. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* **70**: 651–660.

Prochniewicz E, Guhathakurta P, Thomas DD. 2013. The structural dynamics of actin during active interaction with myosin depends on the isoform of the essential light chain. *Biochemistry* **52**: 1622–1630.

Pucci AR, Griffin L, Cafarelli E. 2006. Maximal motor unit firing rates during isometric resistance training in men. *Experimental Physiology* **91**: 171–178.

Purvis D, Gonsalves S, Deuster PA. 2010. Physiological and psychological fatigue in extreme conditions: overtraining and elite athletes. *PM & R: the journal of injury, function, and rehabilitation* **2**: 442–450.

Pylypenko O, Houdusse AM. 2011. Essential ‘ankle’ in the myosin lever arm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 5–6.

Pyne DB, Mujika I, Reilly T. 2009. Peaking for optimal performance: Research limitations and future directions. *Journal of Sports Sciences* **27**: 195–202.

Rayment I, Holden HM, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA. 1993a. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science (New York, N.Y.)* **261**: 58–65.

Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM. 1993b. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science (New York, N.Y.)* **261**: 50–58.

Reconditi M, Brunello E, Linari M, Bianco P, Narayanan T, Panine P, Piazzesi G, Lombardi V, Irving M. 2011. Motion of myosin head domains during activation and force development in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 7236–7240.

Reimann EM, Umfleet RA. 1978. Selective precipitation of ^{32}P onto filter papers. Application to ATPase and cyclic AMP phosphodiesterase determination. *Biochimica Et Biophysica Acta* **523**: 516–521.

Renders J. 1995. *Algorithmes génétiques et réseaux de neurones*. Paris: Hermès.

Reubold TF, Eschenburg S, Becker A, Kull FJ, Manstein DJ. 2003. A structural model for actin-induced nucleotide release in myosin. *Nature Structural Biology* **10**: 826–830.

Rinaldi C, Haddad F, Bodell PW, Qin AX, Jiang W, Baldwin KM. 2008. Intergenic bidirectional promoter and cooperative regulation of the IIX and IIB MHC genes in fast skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **295**: R208–218.

Roels B, Reggiani C, Reboul C, Lionne C, Iorga B, Obert P, Tanguy S, Gibault A, Jouglu A, Travers F, *et al.* 2008. Paradoxical effects of endurance training and chronic hypoxia on myofibrillar ATPase activity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **294**: R1911–1918.

van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm RJ, Olson EN. 2009. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Developmental Cell* **17**: 662–673.

Rosenberg M, Straussman R, Ben-Ya’acov A, Ronen D, Ravid S. 2008. MHC-IIB filament assembly and cellular localization are governed by the rod net charge. *PloS One* **3**: e1496.

Sanchez AMJ, Candau RB, Csibi A, Pagano AF, Raibon A, Bernardi H. 2012. The role of AMP-activated protein kinase in the coordination of skeletal muscle turnover and energy homeostasis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **303**: C475–485.

Sanchez AMJ, Galbès O, Fabre-Guery F, Thomas L, Douillard A, Py G, Busso T, Candau RB. 2013. Modelling training response in elite female gymnasts and optimal strategies of overload training and taper. *Journal of Sports Sciences* **31**: 1510–1519.

Sanchez AMJ, Candau RB, Bernardi H. 2014. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **71**: 1657–1671.

Santos CGM, Pimentel-Coelho PM, Budowle B, de Moura-Neto RS, Dornelas-Ribeiro M, Pompeu F a. MS, Silva R. 2015. The heritable path of human physical performance: from single polymorphisms to the ‘next generation’. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*.

Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. 2013. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *The FEBS journal* **280**: 4294–4314.

Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews* **91**: 1447–1531.

Schluter JM, Fitts RH. 1994. Shortening velocity and ATPase activity of rat skeletal muscle fibers: effects of endurance exercise training. *The American Journal of Physiology* **266**: C1699–1673.

Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. 2009. SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature Methods* **6**: 275–277.

Schoenfeld BJ. 2010. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association* **24**: 2857–2872.

Schoenfeld BJ, Peterson MD, Ogborn D, Contreras B, Sonmez GT. 2015a. Effects of Low- Versus High-Load Resistance Training on Muscle Strength and Hypertrophy in Well-Trained Men. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*.

Schoenfeld BJ, Ogborn DI, Krieger JW. 2015b. Effect of repetition duration during resistance training on muscle hypertrophy: a systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* **45**: 577–585.

Scott BR, Loenneke JP, Slaterry KM, Dascombe BJ. 2015. Blood flow restricted exercise for athletes: A review of available evidence. *Journal of Science and Medicine in Sport / Sports Medicine Australia*.

Sheetz MP, Spudich JA. 1983. Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. *Nature* **303**: 31–35.

Sheterline P, Sparrow JC. 1994. Actin. *Protein Profile* **1**: 1–121.

Shoepe TC, Stelzer JE, Garner DP, Widrick JJ. 2003. Functional adaptability of muscle fibers to long-term resistance exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **35**: 944–951.

Sohn RL, Vikstrom KL, Strauss M, Cohen C, Szent-Gyorgyi AG, Leinwand LA. 1997. A 29 residue region of the sarcomeric myosin rod is necessary for filament formation. *Journal of Molecular Biology* **266**: 317–330.

Sousa DR, Stagg SM, Stroupe ME. 2013. Cryo-EM structures of the actin:tropomyosin filament reveal the mechanism for the transition from C- to M-state. *Journal of Molecular Biology* **425**: 4544–4555.

De Souza RWA, Aguiar AF, Carani FR, Campos GER, Padovani CR, Silva MDP. 2011. High-intensity resistance training with insufficient recovery time between bouts induce atrophy and alterations in myosin heavy chain content in rat skeletal muscle. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* **294**: 1393–1400.

Squire JM, Parry DAD. 2005. Comparative motile mechanisms in cells. *Advances in Protein Chemistry* **71**: 1–15.

Stehle R, Solzin J, Iorga B, Poggesi C. 2009. Insights into the kinetics of Ca²⁺-regulated contraction and relaxation from myofibril studies. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* **458**: 337–357.

Stevens J. 1986. *Applied Multivariate Statistics for the social sciences*.

Stull JT, Kamm KE, Vandenboom R. 2011. Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **510**: 120–128.

Sugi H, Chaen S, Kobayashi T, Abe T, Kimura K, Saeki Y, Ohnuki Y, Miyakawa T, Tanokura M, Sugiura S. 2014. Definite differences between in vitro actin-myosin sliding and muscle contraction as revealed using antibodies to myosin head. *PloS One* **9**: e93272.

Sweeney HL, Yang Z, Zhi G, Stull JT, Trybus KM. 1994. Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 1490–1494.

Sweeney HL. 1995. Function of the N terminus of the myosin essential light chain of vertebrate striated muscle. *Biophysical Journal* **68**: 112S–118S; discussion 118S–119S.

Sweeney HL, Houdusse A. 2010. Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annual Review of Biophysics* **39**: 539–557.

Sweeney HL, Stull JT. 1990. Alteration of cross-bridge kinetics by myosin light chain phosphorylation in rabbit skeletal muscle: implications for regulation of actin-myosin interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 414–418.

- Sweet TW, Foster C, McGuigan MR, Brice G. 2004.** Quantitation of resistance training using the session rating of perceived exertion method. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association* **18**: 796–802.
- Szent-Gyorgyi AG. 1953.** Meromyosins, the subunits of myosin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **42**: 305–320.
- Takahashi K, Mori T, Nakamura H, Tonomura Y. 1965.** ATP-induced contraction of sarcomeres. *Journal of Biochemistry* **57**: 637–649.
- Takarada Y, Takazawa H, Sato Y, Takebayashi S, Tanaka Y, Ishii N. 2000.** Effects of resistance exercise combined with moderate vascular occlusion on muscular function in humans. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **88**: 2097–2106.
- Takarada Y, Sato Y, Ishii N. 2002.** Effects of resistance exercise combined with vascular occlusion on muscle function in athletes. *European Journal of Applied Physiology* **86**: 308–314.
- Tamaki T, Uchiyama S, Nakano S. 1992.** A weight-lifting exercise model for inducing hypertrophy in the hindlimb muscles of rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **24**: 881–886.
- Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA, Phillips SM. 2009.** Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **107**: 987–992.
- Tesi C, Colomo F, Piroddi N, Poggese C. 2002.** Characterization of the cross-bridge force-generating step using inorganic phosphate and BDM in myofibrils from rabbit skeletal muscles. *The Journal of Physiology* **541**: 187–199.
- Thiel C, Vogt L, Bürklein M, Rosenhagen A, Hübscher M, Banzer W. 2011.** Functional overreaching during preparation training of elite tennis professionals. *Journal of Human Kinetics* **28**: 79–89.
- Thomas L. 2009.** Etude théorique des effets de l'entraînement sur la performance : application à l'optimisation des charges d'entraînement pendant la préparation terminale pour une compétition.
- Thomas L, Busso T. 2005.** A theoretical study of taper characteristics to optimize performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **37**: 1615–1621.
- Thomas L, Mujika I, Busso T. 2008.** A model study of optimal training reduction during pre-event taper in elite swimmers. *Journal of Sports Sciences* **26**: 643–652.
- Timson BF. 1990.** Evaluation of animal models for the study of exercise-induced muscle enlargement. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **69**: 1935–1945.
- Trappe S, Williamson D, Godard M, Porter D, Rowden G, Costill D. 2000a.** Effect of resistance training on single muscle fiber contractile function in older men. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **89**: 143–152.

Trappe S, Godard M, Gallagher P, Carroll C, Rowden G, Porter D. 2001. Resistance training improves single muscle fiber contractile function in older women. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **281**: C398–406.

Trappe S, Costill D, Thomas R. 2000b. Effect of swim taper on whole muscle and single muscle fiber contractile properties. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **32**: 48–56.

Trappe S, Williamson D, Godard M. 2002. Maintenance of whole muscle strength and size following resistance training in older men. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* **57**: B138–143.

Uyeda TQ, Abramson PD, Spudich JA. 1996. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 4459–4464.

Varga A, Lionne C, Lallemand P, Szabó J, Adamek N, Valentin C, Vas M, Barman T, Chaloin L. 2009. Direct kinetic evidence that lysine 215 is involved in the phospho-transfer step of human 3-phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* **48**: 6998–7008.

Várkuti BH, Yang Z, Kintses B, Erdélyi P, Bárdos-Nagy I, Kovács AL, Hári P, Kellermayer M, Vellai T, Málnási-Csizmadia A. 2012. A novel actin binding site of myosin required for effective muscle contraction. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 299–306.

Volkman N, Hanein D, Ouyang G, Trybus KM, DeRosier DJ, Lowey S. 2000. Evidence for cleft closure in actomyosin upon ADP release. *Nature Structural Biology* **7**: 1147–1155.

Wagner PD, Weeds AG. 1977. Studies on the role of myosin alkali light chains. Recombination and hybridization of light chains and heavy chains in subfragment-1 preparations. *Journal of Molecular Biology* **109**: 455–470.

Wallace LK, Slattery KM, Coutts AJ. 2009. The ecological validity and application of the session-RPE method for quantifying training loads in swimming. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association* **23**: 33–38.

Wallace LK, Slattery KM, Coutts AJ. 2014. A comparison of methods for quantifying training load: relationships between modelled and actual training responses. *European Journal of Applied Physiology* **114**: 11–20.

Weeds AG, Taylor RS. 1975. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. *Nature* **257**: 54–56.

Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL. 1999. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* **401**: 505–508.

Whitley D. 1993. *A Genetic Algorithm Tutorial*. Colorado State University, department of computer science.

Widrick JJ, Bangart JJ, Karhanek M, Fitts RH. 1996a. Soleus fiber force and maximal shortening velocity after non-weight bearing with intermittent activity. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **80**: 981–987.

- Widrick JJ, Trappe SW, Blaser CA, Costill DL, Fitts RH. 1996b.** Isometric force and maximal shortening velocity of single muscle fibers from elite master runners. *The American Journal of Physiology* **271**: C666–675.
- Widrick JJ, Romatowski JG, Bain JL, Trappe SW, Trappe TA, Thompson JL, Costill DL, Riley DA, Fitts RH. 1997.** Effect of 17 days of bed rest on peak isometric force and unloaded shortening velocity of human soleus fibers. *The American Journal of Physiology* **273**: C1690–1699.
- Widrick JJ, Stelzer JE, Shoepe TC, Garner DP. 2002.** Functional properties of human muscle fibers after short-term resistance exercise training. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **283**: R408–416.
- Wilkinson SB, Tarnopolsky MA, Macdonald MJ, Macdonald JR, Armstrong D, Phillips SM. 2007.** Consumption of fluid skim milk promotes greater muscle protein accretion after resistance exercise than does consumption of an isonitrogenous and isoenergetic soy-protein beverage. *The American Journal of Clinical Nutrition* **85**: 1031–1040.
- Wilkinson DJ, Hossain T, Hill DS, Phillips BE, Crossland H, Williams J, Loughna P, Churchward-Venne TA, Breen L, Phillips SM, et al. 2013.** Effects of leucine and its metabolite β -hydroxy- β -methylbutyrate on human skeletal muscle protein metabolism. *The Journal of Physiology* **591**: 2911–2923.
- Willoughby DS, Nelson MJ. 2002.** Myosin heavy-chain mRNA expression after a single session of heavy-resistance exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **34**: 1262–1269.
- Wong TS, Booth FW. 1988.** Skeletal muscle enlargement with weight-lifting exercise by rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **65**: 950–954.
- Wood RE, Hayter S, Rowbottom D, Stewart I. 2005.** Applying a mathematical model to training adaptation in a distance runner. *European Journal of Applied Physiology* **94**: 310–316.
- Yanagida T, Nakase M, Nishiyama K, Oosawa F. 1984.** Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature* **307**: 58–60.
- Yanagida T, Kitamura K, Tanaka H, Hikikoshi Iwane A, Esaki S. 2000.** Single molecule analysis of the actomyosin motor. *Current Opinion in Cell Biology* **12**: 20–25.
- Yarasheski KE, Lemon PW, Gilloteaux J. 1990.** Effect of heavy-resistance exercise training on muscle fiber composition in young rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **69**: 434–437.
- Yasuda T, Brechue WF, Fujita T, Shirakawa J, Sato Y, Abe T. 2009.** Muscle activation during low-intensity muscle contractions with restricted blood flow. *Journal of Sports Sciences* **27**: 479–489.
- Zanchi NE, de Siqueira Filho MA, Lira FS, Rosa JC, Yamashita AS, de Oliveira Carvalho CR, Seelaender M, Lancha-Jr AH. 2009.** Chronic resistance training decreases MuRF-1 and Atrogin-1 gene expression but does not modify Akt, GSK-3 β and p70S6K levels in rats. *European Journal of Applied Physiology* **106**: 415–423.

Zurmanová J, Soukup T. 2013. Comparison of myosin heavy chain mRNAs, protein isoforms and fiber type proportions in the rat slow and fast muscles. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **62**: 445–453.